

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

PROTEOMA EPIDIDIMÁRIO DE OVINOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

RAMON ALVES DA CUNHA

Botucatu, SP
outubro – 2025.

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

PROTEOMA EPIDIDIMÁRIO DE OVINOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

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

Ramon Alves da Cunha
Orientador: Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira
Coorientador: Dr. Henry David Mogollón
García

Botucatu, SP
outubro – 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

D119p	da Cunha, Ramon Alves Proteoma epididimário de ovinos sob estresse térmico / Ramon Alves da Cunha. -- Botucatu, 2025 64 p.
	Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira Coorientador: Henry David Mongollón García
	1. Estresse térmico. 2. Proteoma. 3. Proteínas. 4. Epidídimo. 5. Ovinos. I. Título.

Nome do autor: Ramon Alves da Cunha

Título: PROTEOMA EPIDIDIMÁRIO DE OVINOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Titular. João Carlo Pinheiro Ferreira

Orientador

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

Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Departamento: Patologia, Reprodução e Saúde Única

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias de Jaboticabal/SP

Dra. Thaisy Tino Dellaqua

Departamento: Laboratório de produção in vitro de embriões

CEO Genetics - Reprodução Animal - São Manuel/SP

Data da defesa: 29 de outubro de 2025.

Agradecimentos

Expresso meus mais sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À equipe do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ/UNESP), campus de Botucatu – Rubião Júnior, pelo acolhimento, pelo apoio técnico e científico.

Ao Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, pela orientação segura, pelos ensinamentos transmitidos e disponibilidade em compartilhar seu conhecimento. Agradeço pela confiança depositada, pelo incentivo ao pensamento crítico e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa científica.

À Prof.^a Dra. Fabiana Ferreira de Souza e a toda a equipe do Laboratório de Proteômica Aplicada à Reprodução Animal (LAPROT), pelas contribuições essenciais nas etapas de processamento das amostras, análises proteômicas e interpretação dos resultados. Agradeço também pela troca de experiências, pelo suporte técnico especializado e pelo ambiente de aprendizado proporcionado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNEPEM), pela infraestrutura de excelência disponibilizada, bem como pelo apoio técnico na coleta e processamento dos dados proteômicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido, por meio da concessão de bolsa de estudos, que viabilizou a execução deste projeto e possibilitou minha dedicação integral às atividades de pesquisa e formação acadêmica.

Por fim, estendo meus agradecimentos a todos os colegas, amigos e familiares que, com palavras de incentivo, compreensão e apoio emocional, contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta etapa da minha trajetória acadêmica.

CUNHA, R. A. **PROTEOMA EPIDIDIMÁRIO DE OVINOS SOB ESTRESSE TÉRMICO**. Botucatu – SP. 2025. 68p. Defesa de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As mudanças climáticas levantam preocupações quanto ao possível aumento na ocorrência de ondas de calor e, conseqüentemente, à exposição ao estresse térmico. O efeito do estresse térmico na reprodução é complexo e pode resultar em modulação negativa do sistema endócrino, da viabilidade dos gametas e dos desfechos gestacionais em ruminantes. Com base na hipótese de que o estresse térmico afeta o proteoma epididimário, este estudo teve como objetivo investigar o perfil proteômico do tecido epididimário de carneiros submetidos a estresse térmico testicular induzido por insulação escrotal. Foram utilizados 25 carneiros (Santa Inês × Dorper), divididos em cinco grupos ($n = 5$): controle (castrados sem insulação escrotal), 24h (isolados por 24 horas e castrados após a insulação), 48h (isolados por 48 horas e castrados em seguida), 7d e 14d (isolados por 48 horas e castrados, respectivamente, sete e quatorze dias após a insulação). A insulação escrotal foi realizada com o uso de fraldas descartáveis cobrindo o saco escrotal, e a castração seguiu a técnica de orquiectomia aberta. Amostras epididimárias foram submetidas à eletroforese e processadas por digestão in-gel com tripsina. Após isso as amostras foram concentradas a vácuo e encaminhadas ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e analisadas por espectrometria de massas. A espectrometria de massas identificou 528 proteínas nas diferentes regiões epididimárias analisadas. Na cabeça, foram identificadas 63 proteínas, das quais 50 foram proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) ($P < 0,05$); no corpo, foram detectadas 46 proteínas, sendo 33 DAPs ($P < 0,05$); e na cauda, foram identificadas 47 proteínas, com 39 DAPs ($P < 0,05$). A análise do VIP Score identificou as 15 proteínas diferencialmente abundantes mais relevantes por segmento, destacando seu comportamento ao longo do tempo, considerando um limiar de $\geq 1,0$. As análises de ontologia gênica e de interação entre proteínas indicaram que, sob estresse térmico, o órgão inicialmente adota mecanismos de proteção nos momentos 24 e 48 horas (agudos) de estresse térmico testicular. Após o cessar do estresse, nos momentos 7 e 14 dias (crônicos), as proteínas atuam na reparação celular e tecidual, promovendo a recuperação dos danos induzidos pelo estresse térmico. Inicialmente, o organismo ativa mecanismos de defesa para minimizar danos nos momentos agudos, mas, quando insuficientes, direciona esforços para a recuperação celular nos momentos crônicos. Este estudo pioneiro demonstra que o estresse térmico afeta de forma negativa o proteoma do epidídimo em carneiros, evidenciando a importância de investigar os mecanismos para mitigar seus impactos na fertilidade masculina.

Palavras chaves: Proteínas, epidídimo, carneiros, insulação testicular.

CUNHA, R. A. **EPIDIDYMAL PROTEOME OF SHEEP UNDER HEAT STRESS**. Botucatu – SP. 2025. 68 p. Master's Thesis – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University (UNESP).

ABSTRACT

Climate change raises concerns about the potential increase in the occurrence of heatwaves and, consequently, greater exposure to heat stress. The effects of heat stress on reproduction are complex and may result in negative modulation of the endocrine system, gamete viability, and pregnancy outcomes in ruminants. Based on the hypothesis that heat stress affects the epididymal proteome, this study aimed to investigate the proteomic profile of epididymal tissue in rams subjected to testicular heat stress induced by scrotal insulation. Twenty-five rams (Santa Inês × Dorper) were used and divided into five groups (n = 5): control (castrated without scrotal insulation), 24 h (insulated for 24 hours and castrated afterward), 48 h (insulated for 48 hours and then castrated), 7 d and 14 d (insulated for 48 hours and castrated seven and fourteen days after insulation, respectively). Scrotal insulation was performed using disposable diapers covering the scrotal sac, and castration followed the open orchietomy technique. Epididymal samples were subjected to electrophoresis and processed by in-gel trypsin digestion. The samples were vacuum-concentrated and sent to the National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM) for mass spectrometry analysis. Mass spectrometry identified 528 proteins across the different epididymal regions. In the caput, 63 proteins were identified, of which 50 were differentially abundant proteins (DAPs) ($P < 0.05$); in the corpus, 46 proteins were detected, including 33 DAPs ($P < 0.05$); and in the cauda, 47 proteins were identified, with 39 DAPs ($P < 0.05$). VIP Score analysis identified the 15 most relevant DAPs per segment, highlighting their temporal expression patterns with a threshold of ≥ 1.0 . Gene ontology and protein–protein interaction analyses indicated that, under heat stress, the epididymis initially adopts protective mechanisms during the acute phases (24 and 48 h) of testicular stress. After the cessation of stress, at the chronic phases (7 and 14 d), proteins participate in cellular and tissue repair, promoting recovery from heat-induced damage. Initially, the organism activates defense mechanisms to minimize acute damage; however, when these are insufficient, it redirects efforts toward cellular recovery during the chronic stages. This pioneering study demonstrates that heat stress negatively affects the epididymal proteome in rams, underscoring the importance of investigating adaptive mechanisms to mitigate its impacts on male fertility.

Keywords: Proteins, epididymis, rams, testicular insulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise PLS-DA do proteoma epididimário de carneiros submetidos à insulação escrotal. Os resultados são apresentados para as seguintes regiões: (A) cabeça (Ca; variância cumulativa: 43,9%), (B) corpo (Co; variância cumulativa: 38,1%) e (C) cauda (Cd; variância cumulativa: 59,6%).

Figura 2. Gráfico de VIP score das 15 principais proteínas diferencialmente abundantes (limiar $\geq 1,0$) no proteoma epididimário de carneiros submetidos à insulação escrotal (IE). A) Cabeça, B) Corpo e C) Cauda do epidídimo. A escala de cores representa a abundância das proteínas (vermelho: maior; azul: menor). Os nomes completos das proteínas estão listados, respectivamente, nas Tabelas Suplementares 1–3.

Figura 3. Análise de ontologia gênica (GO) do proteoma da cabeça do epidídimo de carneiros submetidos à insulação escrotal (IE). A) Componentes celulares, B) Processos biológicos e C) Funções moleculares. Os nomes completos das proteínas estão listados, respectivamente, nas Tabelas Suplementares 1–3.

Figura 4. Análise de ontologia gênica (GO) do proteoma da região do corpo do epidídimo de carneiros submetidos à insulação escrotal (IE). A) Componentes celulares, B) Funções moleculares e C) Processos biológicos. Os nomes completos das proteínas estão listados, respectivamente, nas Tabelas Suplementares 1–3.

Figura 5. Análise de ontologia gênica (GO) do proteoma da região da cauda do epidídimo de carneiros submetidos à insulação escrotal (IE). A) Componentes celulares, B) Funções moleculares e C) Processos biológicos. Os nomes completos das proteínas estão listados, respectivamente, nas Tabelas Suplementares 1–3.

Figura 6. Rede de interação proteína–proteína (PPI) das proteínas diferencialmente abundantes do proteoma das regiões cabeça (A), corpo (B) e cauda (C) do epidídimo de carneiros submetidos à insulação escrotal (IE). Os nomes completos das proteínas estão listados, respectivamente, nas Tabelas Suplementares 1–3.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Estresse térmico	11
2.2 O epidídimo	16
2.3 Espermatogênese e transporte dos espermatozoides no epidídimo	21
2.5 Proteoma epididimário	24
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
4. HIPÓTESES E OBJETIVOS	26
Hipóteses.....	26
Objetivo geral e específico.....	27
5. REFERÊNCIAS	27
ARTIGO CIENTÍFICO	38
1. Introduction	40
2. Material and methods	40
2.2 Scrotal insulation	41
2.3 Surgical procedures and sampling	41
2.4 Analysis of epididymal protein profile	42
2.6 Statistical analysis	44
2.7 Gene ontology	45
3 Results	45
4 Discussion	53
5 Conclusion	58

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O estresse térmico ocorre quando a temperatura ambiente excede a capacidade do organismo de dissipar calor, levando a um desequilíbrio entre a produção e a perda de calor corporal. Essa condição é particularmente crítica em regiões tropicais e subtropicais, onde os animais são frequentemente expostos a altas temperaturas associadas à elevada umidade relativa do ar. A exposição prolongada a esse tipo de ambiente pode comprometer diversas funções biológicas essenciais, incluindo o metabolismo, a resposta imunológica e, sobretudo, os processos reprodutivos (BAGATH et al., 2019).

No caso dos ovinos, animais homeotérmicos, a regulação térmica depende do equilíbrio entre a produção e a dissipação de calor. Possuindo como limite crítico de termoneutralidade entre 12 °C e 32 °C, com umidade relativa entre 50% e 70% (BAËTA E SOUZA, 2010; FURTADO et al., 2021). Quando essa capacidade de termorregulação é excedida, instala-se um desequilíbrio homeostático que pode afetar funções fisiológicas essenciais, ocasionando o aumento da temperatura corporal, desidratação, alterações nas frequências respiratória e cardíaca, falhas reprodutivas, redução da produtividade e, conseqüentemente, à diminuição da rentabilidade e sustentabilidade da ovinocultura (MIEUSSET et al., 1992; SOLEILHAVOUP et al., 2014; ROCHA et al., 2015).

Dentre os sistemas fisiológicos afetados pelo estresse térmico, o reprodutivo é um dos mais sensíveis, com destaque para o comprometimento da função epididimária. O epidídimo é um órgão essencial para a maturação, armazenamento e transporte dos espermatozoides, sendo composto por três regiões distintas: cabeça (caput), corpo (corpus) e cauda (cauda) (KONIG e LIEBICH, 2011). Sua funcionalidade plena depende de mecanismos homeostáticos precisos, que podem ser severamente afetados por condições adversas. O aumento da temperatura escrotal altera a fisiologia epididimária, prejudicando processos fundamentais como a aquisição de motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides, impactando diretamente a fertilidade dos animais (TURNER, 1984; ROBAIRE, HINTON e ORGEBIN-CRIST, 2006; CORNWALL, 2009; SULLIVAN e MIEUSSET, 2016; O'FLAHERTY, 2019).

As proteínas epididimárias, majoritariamente secretadas pelas células epiteliais, interagem com os espermatozoides no lúmen do epidídimo e desempenham papéis essenciais na sua maturação e armazenamento. Alterações nesse proteoma podem comprometer a integridade espermática e, conseqüentemente, a fertilidade. A proteômica permite a caracterização ou a identificação de alterações no perfil proteico em diferentes condições fisiológicas e ambientais, sendo, portanto, uma excelente abordagem para entender os mecanismos moleculares subjacentes aos impactos do estresse térmico sobre a fisiologia epididimária (KOSKIMIES e KORMANO, 1975).

Apesar da relevância do tema, ainda há lacunas significativas no conhecimento sobre as modificações proteômicas no epidídimo de ovinos em situação de estresse térmico. A investigação dos efeitos do estresse térmico sobre o perfil proteico do epidídimo ovino pode fornecer *insights* importantes sobre os processos bioquímicos afetados pela exposição deste órgão a temperaturas supra fisiológicas, permitindo a identificação de proteínas diferencialmente expressas e, conseqüentemente, assinaturas moleculares características.

Considerando que o estresse térmico compromete a função do epidídimo e altera seu perfil proteômico, compreender essas alterações é essencial para mitigar os seus efeitos deletérios sobre a reprodução ovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse térmico

No início do século XIX, surgiram as primeiras observações sobre os efeitos das altas temperaturas nas respostas fisiológicas humanas, especialmente entre trabalhadores expostos constantemente ao calor extremo, como mineiros, ferreiros e operários industriais. Médicos e cientistas da época começaram a relatar casos de exaustão, desidratação e insolação, reconhecendo que a exposição prolongada ao calor intenso poderia provocar sérias alterações fisiológicas e, em alguns casos, a morte (CORNER, SAWYER e LANGLEY, 1904; TALBOTT et al., 1933). Da mesma forma, médicos veterinários e produtores rurais observaram que animais expostos a elevadas temperaturas também apresentavam comprometimento da saúde, o que resultava em queda de produtividade em bovinos, ovinos e aves (BIANCA, 1958; FRANKEL, HOLLANDS e WEISS, 1962; HOFMAN e RIEGLE, 1977).

Esses achados sugeriram que humanos e animais respondiam e apresentavam falhas alostáticas semelhantes quando expostos a temperaturas elevadas. Com base nessas observações, iniciaram-se as investigações sobre as respostas fisiológicas ao calor extremo, tanto em humanos quanto em animais, com foco na sudorese e na circulação sanguínea como mecanismos chave para a regulação térmica (NELSON et al., 1947; DOWLING, 1956; SYMINGTON, 1960; MCLEAN, STEWART e MCLAUGHLIN, 1983).

O estresse é uma resposta inespecífica do organismo a uma ameaça à homeostase, coordenada pelos sistemas nervoso, neuroendócrino e imunológico (SELYE, 1950). Esses sistemas ativam um processo de adaptação ativa denominado de alostase (MCEWEN, 1998). Quando uma ameaça homeostática se mantém por um tempo prolongado, pode ocorrer a sobrecarga dos mecanismos adaptativos levando a falhas ou até mesmo exaustão alostática (MCEWEN, 2000).

Embora o termo estresse térmico possa se referir a respostas tanto ao frio quanto ao calor extremos, na literatura científica é mais comumente associado às respostas alostáticas desencadeadas quando o organismo (FERRAZZA et al., 2017) ou um órgão específico (KASTELIC et al., 2021; RIZZOTO et al., 2020) são expostos a temperaturas acima da faixa de termoneutralidade.

Durante o século XX, o termo estresse térmico se consolidou e passou a ser uma área de pesquisa específica, que foi ganhando importância de acordo com o desenvolvimento do conhecimento fisiológico. Atualmente, em virtude do progressivo aumento da temperatura média global e pelas alterações climáticas extremas, o estresse térmico é o tema mais estudado em animais de produção (FERNANDEZ et al., 2020; ROTH, 2020; ZHA, 2023) e nos humanos (HOSSEINI, GHOLAMI e BONYADI, 2024).

Os principais mecanismos envolvidos na regulação da temperatura em situações de estresse térmico são os não- evaporativos (sensíveis) e os evaporativos (latentes). Os não- evaporativos dependem da interação entre a temperatura do animal e o ambiente em que se encontra, enquanto os mecanismos evaporativos não dependem dessa interação direta, ocorrendo pela sudorese ou a respiração, que promovem a dissipação do calor (SANTOS et al., 2021).

Os mecanismos não- evaporativos envolvem a dissipação de calor por condução, convecção, radiação e por estratégias comportamentais (HOLLOWAY, 1974; COLLIER e GEBREMEDHIN, 2015): Na condução, a dissipação ocorre por meio de contato físico, como acontece quando o animal se deita colocando seu corpo em contato com uma superfície mais fria que sua temperatura corporal. Na convecção, a dissipação acontece para a água ou ar, que estejam

em movimento em torno do corpo do animal. Esse processo pode ocorrer de forma natural, na exposição ao vento, ou forçada, quando depende da ação de ventiladores e aspersores. A dissipação do calor por radiação, por sua vez, ocorre por meio de ondas eletromagnéticas, sem necessidade de contato do corpo com superfícies ou fluidos intermediários. Este processo tem grande importância para os répteis, mas também ocorre nos demais animais (SANTOS et al., 2021). As estratégias comportamentais incluem a busca por áreas sombreadas, na tentativa de reduzir a exposição à radiação solar, a concentração das atividades diárias nos períodos mais frescos do dia, a busca ativa por água para ingestão e resfriamento, e a diminuição da ingestão de alimento, uma vez que os processos metabólicos relacionados a digestão produzem calor (FERRAZZA et al., 2017; SANTOS et al., 2021).

Por sua vez, os mecanismos evaporativos estão relacionados à processos que envolvem a evaporação da água, sendo os principais a sudorese e a ofegação. A sudorese, seguida pela evaporação do suor, é um mecanismo de resfriamento corporal muito comum nos mamíferos, pois no processo de evaporação ocorre o resfriamento do corpo (SANTOS et al., 2021; GUJAR et al., 2023). Contudo, este mecanismo depende muito da umidade relativa, circulação de ar e número de glândulas sudoríparas, que variam entre as espécies animais. Um estudo com pele de bovinos, búfalos, cavalos, cabras, suínos e cães adultos identificou em média, 1,6 glândulas sudoríparas por mm² em cabras, 1,27 em cavalos, 1,25 em bovinos, 1,07 em cães, 0,98 em búfalos e 0,44 em suínos, sendo os equinos detentores das glândulas sudoríparas mais funcionais, seguido de alguns bovinos zebuínos, ovinos, caprinos, suínos, cães e gatos, respectivamente (RAGHAV, UPPAL e GUPTA, 2021). Na respiração ofegante ou ofegação, que ocorre em várias espécies, como aves, suíno, ovinos e bovinos, os animais elevam a frequência respiratória elevando a taxa de evaporação de água na superfície das vias respiratória, dissipando o calor corporal. As aves são extremamente dependentes deste processo, uma vez que não possuem glândulas sudoríparas (GUJAR et al., 2023).

Como estratégias complementares, aparecem os banho e lambedura. Os suínos, que possuem um menor número de glândulas sudoríparas funcionais, são dependentes, principalmente do banho de lama, enquanto alguns primatas utilizam a lambedura para depositar saliva sobre a pele e pelos, que ao evaporar atua de forma semelhante ao suor na dissipação do calor (WARK, KUHAR e LUKAS, 2014).

Quando nenhum destes mecanismos for suficiente, ocorre uma falha alostática e o animal não mantém sua temperatura nos limites fisiológicos, ocorrendo a exacerbação do aumento da

frequência respiratória, salivação excessiva, desidratação, desequilíbrio ácido-base (HOFMAN e RIEGLE, 1977; RIZZOTO e KASTELIC, 2020) e, em casos mais severos, a morte (Roth et al., 2020).

Com o aumento da temperatura corporal, ocorre a ativação do centro termorregulador no hipotálamo, responsável pela ativação das respostas fisiológicas dos diversos sistemas do corpo (HYDER et al., 2017).

Durante o estresse térmico, no sistema cardiovascular ocorre vasodilatação periférica, podendo ocorrer taquicardia e redução da pressão arterial (LI et al., 2021). A taquicardia ocorre para manter o débito cardíaco (MINSON et al., 1998; NDLOVU e CHUNGAG, 2024), contudo, caso esse aumento não seja suficiente para manter o fluxo sanguíneo para órgãos vitais, intensifica o risco de falência orgânica, principalmente em indivíduos portadores de distúrbio cardíaco (KAISER et al., 2007). A vasodilatação periférica excessiva pode levar à queda da pressão arterial e, conseqüentemente, à hipotensão, prejudicando o fornecimento de oxigênio e a eliminação de compostos tóxicos e metabólitos. Em casos mais graves, o coração pode entrar em exaustão, devido a elevação excessiva da demanda de oxigênio pelo miocárdio, resultando em colapso cardiovascular (CHASELING et al., 2021).

O aumento da frequência respiratória é um achado comum em várias espécies sob estresse térmico, (SRIKANDAKUMAR, JOHNSON e MAHGOUB, 2003; FERRAZZA et al., 2017). Contudo, a taquipneia excessiva é um fator de sobrecarga do sistema respiratório podendo levar também a desequilíbrios acidobásicos com subsequente alcalose respiratória e falhas nas trocas gasosas pulmonares, que em casos mais graves causa hipoxemia e comprometimento dos órgãos vitais (SRIKANDAKUMAR, JOHNSON e MAHGOUB, 2003).

O sistema imunológico também pode ser comprometido pelo estresse térmico. O calor excessivo, ativa os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e simpático-adrenal-medular (SAM) o que resulta em maior produção dos hormônios cortisol e adrenalina e, conseqüentemente, alterações na resposta imunológica (CHAUHAN et al., 2021). O cortisol, hormônio esteroide produzido pelas glândulas adrenais, é essencial para as respostas do organismo a estímulos estressantes. O estresse térmico causa um quadro inflamatório sistêmico, com elevação de citocinas inflamatórias. Estudos com vacas em lactação e no período de transição, expostas a estresse térmico identificaram maiores concentrações séricas de TNF- α e interleucina 10 (IL-10) (TAO et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Em um outro estudo, vacas holandesas foram submetidas a estresse térmico e apresentaram uma elevação sérica da

concentração de IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β 1 e outros componentes responsáveis pela via de ativação do sistema imunológico (KOCH et al., 2019). Em ovinos, o estresse aumentou a expressão dos receptores de IL-1, IL-2 e HSPA2 (LU et al., 2019). Curiosamente, em vacas leiteiras de 5 a 7 semanas pós-parto, Safa et al (2019) observaram um efeito contrário, pois o estresse térmico reduziu as concentrações séricas de TNF- α , IL-1 α e IL-2.

O estresse térmico compromete significativamente a função testicular, sendo esse impacto refletido por alterações nos parâmetros seminais que geralmente se manifestam entre 7 e 14 dias após o insulto térmico, a depender da intensidade e da duração da exposição ao calor (TEIXEIRA et al., 2025). As alterações mais frequentemente observadas, são a redução na concentração espermática, aumento na proporção de espermatozoides anormais, elevação do número de patologias espermáticas e a diminuição da motilidade dos espermatozoides viáveis. Embora o organismo apresente certa capacidade de recuperação após o fim do estresse térmico, a restauração completa da espermatogênese e da qualidade seminal ocorre somente após um período aproximado de 60 dias, correspondendo ao ciclo completo de renovação espermatogênica (HAMILTON et al., 2016).

Os mecanismos envolvidos na etiopatogenia do estresse térmico ainda não estão bem elucidados, acreditava-se que uma hipóxia testicular justificaria as alterações seminais, contudo, um estudo com carneiros avaliou o efeito da hipóxia e do estresse térmico testicular, avaliando os parâmetros seminais isoladamente e concluíram que as alterações espermáticas foram gerada exclusivamente pela hipertermia testicular, onde 30 horas de hipertermia foi suficiente para cair de 80 para 20 a porcentagem de espermatozoides normais dos animais insulados enquanto a hipóxia não resultou em dados significantes (KASTELIC et al., 2017). Adicionalmente, estudos em carneiros e touros demonstraram que o aquecimento testicular agudo induz aumento do fluxo sanguíneo na artéria testicular (RIZZOTO et al., 2019, RIZZOTO et al., 2020b). Com base nessa descoberta, os estudos sobre degeneração testicular e estresse térmico passaram a concentrar-se nas alterações decorrentes da exposição prolongada a altas temperaturas, com ênfase nos níveis celulares e moleculares. Essas investigações vêm demonstrando que o aumento das concentrações das espécies reativas de oxigênio, a diminuição da concentração de testosterona no parênquima testicular (RIZZOTO et al., 2020a) e a elevada taxa de apoptose nas células germinativas dos túbulos seminíferos (LI et al., 2013) estão intimamente ligados às consequências deletérias do estresse térmico na função testicular e consequente comprometimento da espermatogênese.

2.2 O epidídimo

O epidídimo consiste em um único ducto longo, revestido por musculatura lisa, extremamente enrolado, que apresenta três regiões distintas – cabeça, corpo e cauda-, sendo que cada uma delas possui funções diferentes. Nos mamíferos, em cada uma dessas regiões, as diversas voltas do ducto epididimário estão organizadas em lóbulos, que se encontram separados por septos de tecido conjuntivo (ARROTIA et al., 2012).

A cabeça é a parte mais volumosa do órgão. Localizada nos ruminantes aderida na parte superior do testículo, tem aspecto liso, ligeiramente ondulado, formato arredondado e cônico, textura firme, devido ao maior volume de seus ductos, e coloração variando entre branca e esbranquiçada. Seu ducto se comunica ao testículo pelos ductos eferentes oriundos da rede testicular (ARROTIA et al., 2012). O epitélio da cabeça do epidídimo é pseudoestratificado e composto majoritariamente por células principais, seguidas pela basais e de apoio (ARROTIA et al., 2012). O lúmen ductal nesta região é relativamente mais estreito em relação ao da cauda, e seu epitélio possui estereocílios, que são prolongamentos celulares semelhantes a cílios, localizados na região apical das células principais (ROBAIRE, HINTON e ORGEBIN-CRIST, 2006). A principal função deste segmento é atuar na maturação espermática. Seu fluido é rico em lipocalinas, glicoproteínas, proteases, cisteínas e antioxidantes, que participam de vários processos moleculares e bioquímicos (SULLIVAN e MIEUSSET, 2016). A cabeça também desempenha um papel importante na modulação do pH do fluido, mantendo os espermatozoides quiescentes por meio da modulação de íons de cálcio e bicarbonato (YOUNG, 1931). Nesta região ocorrem também modificações das proteínas da membrana espermática pela adição de cisteínas e o início da aquisição da capacidade de fertilização (DACHEUX, GATTI e DACHEUX, 2003).

O corpo está localizado ao longo da parte medial caudal do testículo,. Apresenta superfície lisa e formato estreito e alongado e funciona como região de transição entre a cabeça e a cauda (KONIG e LIEBICH, 2011). A espessura de sua parede e o diâmetro do ducto desta região são menores que os da cabeça. As funções principais desta região é realizar a reabsorção de fluido e continuar a maturação dos espermatozoides, promovendo sua preparação final para a capacitação e fertilização (ARROTIA et al., 2012). Os ductos desta região, revestidos por epitélio pseudocilíndrico composto por células principais, basais, ciliadas e de revestimento, possui peristaltismo que promove o fluxo contínuo do fluido epididimário e dos

espermatozoides em direção à cauda (ROBAIRE, HINTON e ORGEBIN-CRIST, 2006). Neste segmento ocorre a secreção de proteínas ligadoras de cátions, como as lactoferrinas, que ajudam a proteger os espermatozoides contra o estresse oxidativo, (ZHARANI et al., 2024). No corpo do epidídimo, ocorrem importantes interações hormonais envolvendo testosterona, estradiol e prolactina, que desempenham um papel fundamental na regulação da maturação espermática. À medida que os espermatozoides transitam por essa região, eles sofrem modificações metabólicas, como a capacidade de processamento da glicose e lactato, alterações nas suas membranas celulares, adquirindo motilidade potencial e capacidade de fertilização. Essas mudanças capacitam os espermatozoides a realizarem a reação acrossômica, um passo essencial para a fecundação. Além disso, neste segmento, ocorre a remoção de substâncias tóxicas e radicais livres, garantindo que os espermatozoides mantenham sua integridade e capacidade de fertilização (YOUNG, 1931).

A cauda do epidídimo, a região mais distal do órgão, apresenta formato alongado e estreito. Nas espécies que produzem grandes quantidades de espermatozoides e/ou ejaculações pouco frequentes, como os bovinos e garanhões, a cauda tende a ser maior. Essa região é responsável por armazenar os espermatozoides maduros, podendo acumular uma grande quantidade deles antes da ejaculação (KÖNIG; LIEBICH, 2011). A cauda termina conectando-se ao ducto deferente e apresenta textura mais firme em comparação com as demais regiões do órgão. Possui uma aparência mais enovelada e espessa, além de apresentar maior diâmetro dos ductos epididimários, o que está diretamente relacionado à sua elevada capacidade de armazenamento de espermatozoides maduros (ARROTIA et al., 2012).

Com um epitélio mais espesso e pouco ciliado, essa região exibe menor atividade metabólica em comparação com a cabeça e o corpo do epidídimo. A camada de musculatura peritubular é mais fina, mas ainda é funcionalmente eficiente na condução dos espermatozoides até o ducto deferente. Além disso, a cauda é responsável pela concentração dos espermatozoides, processo mediado pela reabsorção de fluidos epididimários por meio de canais iônicos, como os de sódio e cloro, que ajudam a manter a osmolaridade do fluido e a adequada concentração dos espermatozoides (VELEZ; NIEDERBERGER, 2023). Apesar de estarem armazenados, os espermatozoides continuam a metabolizar nutrientes, como a glicose, para gerar energia na forma de ATP, um processo essencial para manter sua viabilidade até a ejaculação. Além disso, a cauda desempenha um papel fundamental na proteção imunológica dos espermatozoides (HEDGER, 2011). Durante o armazenamento, os espermatozoides

adquirem proteínas de membrana que poderiam ser reconhecidas como antígenos pelo sistema imune. No entanto, devido à presença da barreira imunológica epididimária, esses espermatozoides são protegidos contra respostas imunológicas indesejadas, garantindo sua preservação e funcionalidade até o momento da ejaculação (NASHAN et al., 1989). Embora a região da cauda apresente menos processos moleculares em comparação com outras partes do epidídimo, ela ainda desempenha um papel crucial na manutenção da viabilidade e proteção dos espermatozoides (SULLIVAN e BELLEANNÉE, 2018).

A irrigação testicular e do epidídimo é realizada principalmente pela artéria testicular, que, ao alcançar o órgão, ramifica-se em vasos menores que se dirigem a ambas as estruturas (MACMILLAN, 1954; MOSTAFA et al., 2008). Além disso, o epidídimo também recebe irrigação complementar: sua porção inferior é suprida pela artéria cremastérica, um ramo da artéria epigástrica inferior que percorre o cordão espermático, enquanto as porções superior e média (cabeça e corpo) recebem sangue da artéria deferente, derivada da artéria vesical inferior (KORMANO e REIJONEN, 1976).

Os capilares fenestrados presentes no epidídimo desempenham um papel crucial nas trocas gasosas e de nutrientes entre o sangue e o tecido, especialmente nas áreas de alta atividade metabólica do órgão, como a cabeça e o corpo. O retorno venoso é realizado pelas vênulas e veias locais que desembocam na veia testicular, que, por sua vez, conecta-se à veia cava inferior, permitindo que o sangue venoso retorne ao coração (MACMILLAN, 1954).

O epidídimo é innervado pelo sistema simpático e parassimpático, que possuem papéis fundamentais na modulação funcional do órgão (CLEMENT e GIULIANO, 2015). A inervação simpática, mediada pela noradrenalina proveniente dos gânglios simpáticos da região lombosacral, chega ao epidídimo através do plexo espermático, que ramifica-se ao longo do testículo e epidídimo (BAUMGARTEN et al., 1968). Essa inervação é concentrada principalmente na cabeça e no corpo, onde regulam as secreções epididimárias, as contrações da musculatura lisa, vasodilatação e vasoconstrição dos vasos locais, processo importante também para a termorregulação tecidual (BAUMGARTEN et al., 1968).

A função epididimária é regulada por hormônios que atuam no órgão desde a fase embrionária-fetal até a vida adulta. Entre os diversos hormônios que atuam no órgão destacam-se a testosterona, o estradiol e fatores de crescimento sendo comumente encontrados o fator de crescimento epidérmico (EGF), os fatores semelhantes à insulina tipos 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (RAJALAKSHMI, 1985). Durante a fase

embrionária, os gametas masculinos iniciam a produção de testosterona, que modula essencialmente o desenvolvimento dos ductos de Wolff e a diferenciação do epidídimo, ducto deferente e vesículas seminais. Particularmente no epidídimo, a enzima 5-alfa-redutase converte a testosterona em dihidrotestosterona, um andrógeno mais potentes, que vai coordenar a morfogênese e organização do epitélio epididimário (CLEMENT e GIULIANO, 2015; EVANS e GANJAM, 2017). Na puberdade, com a intensificação do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, inicia-se a secreção de modo regular dos hormônios FSH e LH, ocorre o aumento exponencial da produção de testosterona. Esse aumento provoca o incremento no número de receptores de andrógenos no epitélio epididimário, permitindo que estes regulem processos como a produção e secreção proteica no epidídimo, a reabsorção do fluido luminal e formação da barreira hemato-epididimária (RAJALAKSHMI, 1985). Após a puberdade, durante a fase adulta, esses hormônios continuam a atuar de forma sincrônica, mantendo a homeostase do órgão e garantindo os processos de maturação espermática (TOMSIG e TURNER, 2006).

A prolactina sistêmica se liga aos seus receptores epididimário nas células epididimárias, desencadeando uma série de respostas intracelulares relacionadas à modulação da secreção de proteases, proteínas da matriz extracelular e enzimas de fosforilação, que participam da regulação da composição do fluido epididimário. Essa resposta envolve a ativação da transcrição de genes relacionados à produção de proteínas essenciais para a maturação e funcionalidade dos espermatozoides. Além disso, a prolactina amplifica a expressão dos receptores de estradiol nas células epididimárias, aumentando a sensibilidade do órgão às ações deste hormônio (LIU et al., 2024).

No aparelho reprodutor masculino, os andrógenos são convertidos em estradiol pela ação da enzima aromatase nas células de Sertoli e nas células da cabeça e corpo do epidídimo. O estradiol por sua vez, liga-se aos seus receptores nucleares do tipo α e β (ER α e ER β) atuando como fatores transcricionais (JOSEPH, SHUR e HESS, 2011). Essa ligação está relacionada a ativação de diversas vias de sinalização intracelular, como a via PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) (XIA et al., 2019), que desempenha papéis essenciais na regulação do metabolismo celular, na remodelação celular e atividade anti-apoptótica nos testículos e epidídimo (DUBÉ et al., 2012; AL-MAGHREBI e RENNO, 2016). A ativação da via PI3K/Akt está envolvida na modulação das metaloproteinases (MMPs), que são fundamentais para a remodelação do microambiente epididimário. Nos espermatozoides essa via é importante para o

desenvolvimento da capacidade dos espermatozoides interagirem com as células epididimárias, além de modular a permeabilidade das membranas celulares relacionada ao funcionamento dos canais iônicos, como os de sódio, potássio e cálcio (MANNING e TOKER, 2017).

Vários fatores de crescimento participam da regulação das funções epididimárias. Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) apresentam uma estrutura semelhante à da insulina, mediado por testosterona, prolactina e estradiol. O IGF-1 e IGF-2 desempenham papéis cruciais na modulação do fluido epididimário e na sobrevivência espermática, atuando de forma antiapoptótica (GRIFFETH, RICHARD, BIANDA, 2014; TABECKA-LONCZYNSKA et al., 2019). Os IGFs participam do processo de aquisição da motilidade e na futura capacitação espermática, bem como da manutenção viabilidade das células epiteliais do epidídimo e da sua interação com a testosterona (GRIFFETH, RICHARD, BIANDA e NEF, 2014).

Os fatores de crescimento epidérmico (EGF), sintetizados pelas células epiteliais do epidídimo em resposta a ação dos hormônios esteroides, ao ativarem as vias de sinalização MAPK/ERK, PI3K/Akt e JAK/STAT, influenciam o crescimento celular e o reparo tecidual das células epididimárias, bem como a tradução proteica necessária à maturação dos espermatozoides (HO e SUAREZ, 2001; TOMSIG e TURNER, 2006).

Os fatores de crescimento transformadores (TGF- β) possuem atividade imunomoduladora, especialmente no lúmen do epidídimo, regulando a resposta aos antígenos espermáticos, principalmente em condições autoimunes (CHANG, BROWN e MATZUK, 2002; PIERUCCI-ALVES et al., 2018; VOISIN et al., 2020). Já os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) atuam na manutenção do epitélio epididimário, regulando seu metabolismo, proliferação, remodelação e sinalização intracelular (COTTON, O'BRYAN e HINTON, 2008).

O epidídimo sintetiza e libera várias prostaglandinas, incluindo Prostaglandina E2 (PGE₂) (Gregory e Cyr, 2019), Prostaglandina F2 α (PGF₂ α) (TSO e LACY, 1975), Prostaglandina D2 (PGD₂) (GERENA et al., 1998), Tromboxano A2 (TXA₂) e Prostaciclina (PGI₂) (ROSSITTO et al., 2015). Essas prostaglandinas, modulam a contração da musculatura lisa, a proliferação, a diferenciação e a secreção do epitélio epididimário, bem como ativam vias de metabolismo espermático (COSENTINO et al., 1984). A relaxina, um hormônio peptídico da família da insulina, é produzida pelo epidídimo, testículos e próstata, em resposta aos estímulos de testosterona, estradiol e fatores de crescimento. Sua principal função é regular a secreção epididimária, estimulando a tradução proteica e a produção de fatores antioxidantes

(KOHSAKA et al., 2020), e o relaxamento da musculatura lisa do órgão, facilitando o transporte espermático (IVELL, AGOULNIK e ANAND-IVELL, 2017). Promove o remodelamento da membrana espermática e capacitação dos espermatozoides (FEUGANG et al., 2015).

2.3 Espermatogênese e transporte dos espermatozoides no epidídimo

A espermatogênese é um processo que ocorre no interior dos testículos responsável pela transformação das células germinativas masculina em espermatozoides, capazes de fecundarem o oócito da fêmea, dividida em três fases principais: Mitose, Meiose e Espermio gênese (EVANS e GANJAM, 2017).

A espermatogênese tem início durante o desenvolvimento embrionário, quando as células germinativas primordiais migram para os testículos em formação, se multiplicam e formam as espermatogônias, no entanto, essas espermatogônias permanecem em um estado quiescente até a fase da puberdade. A puberdade marca o início da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Nesse período, o hipotálamo passa a liberar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que estimula a hipófise anterior a secretar as gonadotrofinas, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Esses hormônios são fundamentais para o início da espermatogênese e para a maturação dos espermatozoides, processos essenciais para o estabelecimento da função reprodutiva masculina (CHENOWETH e LORTON, 2014).

A mitose é a primeira fase da espermatogênese e ocorre nas espermatogônias, células germinativas diploides ($2n$), ou seja, que possuem 46 cromossomos. As espermatogônias estão localizadas na camada basal dos túbulos seminíferos e se dividem por mitose, resultando em dois espermatócitos primários, mantendo o número diploide de cromossomos (KHALIMOVA, 2024).

A meiose é a segunda fase da espermatogênese e tem como função reduzir o número de cromossomos pela metade, permitindo que as células germinativas se tornem haploides (n) e, assim, possam se fundir com o óvulo durante a fecundação. Esse processo é dividido em duas etapas: meiose I (reducional) e meiose II (equacional). Na meiose I, os espermatócitos primários (ainda com 46 cromossomos) sofrem uma divisão celular na qual ocorre a separação dos cromossomos homólogos, resultando em dois espermatócitos secundários. Cada um deles passa a conter 23 cromossomos, tornando-se, portanto, células haploides (SALOKHIDDINOVNA, 2024).

Em seguida, ocorre a meiose II. Nessa fase, os espermatócitos secundários (haploides) se dividem novamente, mas sem redução no número de cromossomos, apenas separação das

cromátides irmãs. Durante essa divisão, cada espermatócito secundário origina duas espermátides, totalizando quatro espermátides ao final do processo, todas com 23 cromossomos simples (KHALIMOVA, 2024).

A última fase da espermatogênese é a espermiogênese, responsável pela diferenciação das espermátides em espermatozoides imaturos. Embora as espermátides resultantes da meiose já possuam metade do número de cromossomos, elas ainda não estão funcionalmente aptas para a fertilização. Durante a espermiogênese, ocorrem diversas transformações morfológicas e bioquímicas essenciais para a preparação das espermátides para sua função reprodutiva. Entre essas mudanças, destaca-se a condensação do núcleo, que forma a cabeça do espermatozoide contendo o material genético. Há também a formação do acrossomo, uma estrutura em forma de cápsula na região anterior da cabeça, que armazena enzimas essenciais para a penetração no oócito durante a fecundação (SALOKHIDDINOVNA, 2024).

Durante a espermatogênese, a atividade mitocondrial exerce um papel central no fornecimento de energia na forma de ATP, para que as células germinativas se transformem em espermatozoides imaturos. Nos estágios iniciais da espermatogênese, nas espermatogônias e espermatócitos, a atividade mitocondrial é voltada ao suporte energético associado às divisões mitóticas e meióticas. Nessa fase, as mitocôndrias apresentam morfologia esférica dispersas no citoplasma celular (PARK, PANG, 2021). As espermatogônias e espermatócitos primários possuem mitocôndrias menores e com baixa atividade metabólica. À medida que ocorre a diferenciação dos espermatócitos secundários em espermátides e espermatozoides, há uma remodelação mitocondrial, na forma, densidade e distribuição dessas organelas. As mitocôndrias migram e se organizam helicoidalmente ao redor da peça intermediária do flagelo, formando a bainha mitocondrial, uma estrutura altamente especializada que garante o suprimento contínuo de ATP (MARTINO et al., 1979, MANNELLA, 2006).

Outras modificações incluem o desaparecimento de organelas, como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, o que torna a célula mais compacta. O desenvolvimento da cauda, originada a partir do centríolo, fundamental para a motilidade espermática. Além da eliminação de parte do citoplasma, conferindo ao espermatozoide sua forma final, especializada no transporte de material genético. Ao final da espermiogênese, os espermatozoides imaturos são liberados para o interior dos túbulos seminíferos, de onde serão transportados até o epidídimo para sua maturação final (EVANS e GANJAM, 2017; HOPPER, 2021).

Os espermatozoides provenientes dos ductos deferentes chegam à cabeça do epidídimo ainda em um estado imaturo, sem capacidade de fertilização. Nesse segmento do epidídimo, inicia-se o processo de maturação espermática, onde os espermatozoides passam por uma série de modificações moleculares e estruturais, fundamentais para adquirirem capacidade de fertilização (KHALIMOVA, 2024). Uma das primeiras mudanças ocorre na membrana plasmática do espermatozoide, que sofre uma reorganização em sua composição lipídica e proteica. Durante esse processo, há uma incorporação de glicanos e lipídios, auxiliando no reconhecimento e adesão do espermatozoide à zona pelúcida, preparando-o para a fusão com a membrana do oócito durante a fecundação (DACHEUX e DACHEUX, 2014). O processo de maturação também envolve uma reorganização das proteínas dentro do acrossomo, preparando-o para a reação acrossômica. Durante essa reorganização, ocorre a ativação gradual de enzimas como a hialuronidase e acrosina, que fazem digestão da zona pelúcida, facilitando a entrada do espermatozoide (GATTI et al., 1999).

Simultaneamente, há uma mudança no metabolismo energético dos espermatozoides. Inicialmente, esses espermatozoides utilizam glicose como fonte principal de energia, no entanto, à medida que eles percorrem a cabeça e o corpo do epidídimo, ocorre uma adaptação no uso de glicogênio, otimizado para a manutenção de sua motilidade e sustentação aos processos de capacitação e reação acrossômica. Essa mudança no metabolismo é uma preparação essencial para o processo de maturação espermática que continuará ao longo do epidídimo (DACHEUX e DACHEUX, 2014). Por meio de movimentos peristálticos gerados pela musculatura lisa do epidídimo, aliados à ação dos cílios e estereocílios presentes no epitélio, os espermatozoides são transportados da cabeça para o corpo do epidídimo, nesse segmento, ocorrem modificações morfológicas e bioquímicas essenciais para a maturação dos espermatozoides (SULLIVAN e BELLEANNÉE, 2018). Uma das mudanças mais importantes é a perda da gota citoplasmática, um remanescente de citoplasma que acompanha o espermatozoide após a espermatogênese. Essa perda é crucial, pois é necessária para que o espermatozoide atinja um estágio adequado de maturação, além da compactação dos espermatozoides, um processo que envolve a reorganização das suas estruturas internas, resultando em uma configuração mais densa e eficiente para o movimento e interação com o oócito durante a fecundação (DACHEUX e DACHEUX, 2014).

Outro evento crucial é o desenvolvimento da motilidade progressiva, que permite que os espermatozoides se movam de forma eficaz para alcançar o oócito durante a fertilização, nesta fase ocorre uma capacitação parcial dos espermatozoides (HO e SUAREZ, 2001). A

capacitação parcial envolve uma série de modificações bioquímicas, incluindo o aumento intracelular nas concentrações de cálcio. Esse aumento ativa diversas proteínas quinases, que desempenham um papel fundamental na aquisição de mobilidade e na organização estrutural dos espermatozoides, preparando-os para a fase de capacitação completa que ocorrerá posteriormente (LIU, WANG e CHEN, 2012).

Por fim, na cauda do epidídimo, ocorre a consolidação final da maturação dos espermatozoides e seu armazenamento até o momento da ejaculação. Nesse segmento, as proteínas epididimárias desempenham um papel crucial na manutenção da viabilidade dos espermatozoides, garantindo que permaneçam aptos à fertilização quando forem liberados durante a ejaculação (DACHEUX e DACHEUX, 2014). Essas proteínas estão envolvidas na proteção, nutrição e regulação do metabolismo dos espermatozoides, mantendo-os em um estado funcional até a fecundação (CORNWALL, 2009; BJÖRKGREN e SIPILÄ, 2019). Todo esse trânsito do espermatozoide pelo epidídimo leva aproximadamente de 13 a 15 dias em carneiros (MOREIRA, MOURA e ARAÚJO, 2001)

2.5 Proteoma epididimário

O proteoma epididimário compreende o conjunto complexo de proteínas presentes no epidídimo, exercendo funções essenciais na maturação espermática, na regulação do ambiente epididimário, na proteção dos espermatozoides e na manutenção da fertilidade (SULLIVAN e MIEUSSET, 2016).

Os primeiros estudos sobre a função do epidídimo datam do início do século XX, quando se reconheceu seu papel no transporte e armazenamento de espermatozoides, com foco na bioquímica das secreções epididimárias (YOUNG, 1931; HENLE e ZITTLE, 1942; MACMILLAN, 1953; PRASAD e RAJALAKSHMI, 1976). No entanto, apenas a partir da segunda metade do século XX iniciaram-se investigações mais detalhadas sobre a composição proteica do epidídimo, com a identificação individual das proteínas (CAMEO e BLAQUIER, 1976).

Estudos pioneiros em ratos (KOSKIMIES e KORMANO, 1975; KOHANE et al., 1980) e, posteriormente, em bovinos e carneiros (ALUMOT, LENSKY e SCHINDLER, 1971) revelaram perfis proteicos distintos entre os segmentos do epidídimo, levantando a hipótese de que cada região teria funções específicas. Em 1980, a introdução da eletroforese bidimensional associada

à coloração por prata e imunoprecipitação possibilitou uma análise mais precisa da abundância proteica (DEPEIGES e DUFAURE, 1980). Já em 1990, o uso do Western blotting associado à imunoprecipitação permitiu a quantificação de proteínas específicas, muitas delas relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo e à capacitação espermática. Com o avanço da espectrometria de massas, por volta dos anos 2000, os estudos proteômicos tornaram-se mais sensíveis e precisos (KOHANE et al., 1980).

As proteínas epididimárias são fundamentais para a maturação dos espermatozoides, participando de processos como aquisição da motilidade, capacidade de fertilização, proteção contra estresse oxidativo e interação com o oócito (KOHANE et al., 1980). Elas são transferidas aos espermatozoides via fluido epididimário e epididimossomos, que são vesículas extracelulares liberadas pelo epitélio do epidídimo (JAMES et al., 2020).

A composição proteica do epidídimo varia conforme a região e a espécie, refletindo sua capacidade de secreção e absorção. Dentre as proteínas mais comumente encontradas destacam-se: Clusterina (FRITZ et al., 1983), proteínas ligantes de peptídeos (BPS), P3AH, glutathione peroxidase (GPX), beta-defensinas, CRES, lipocalina 8, anexinas, proteínas do sistema ubiquitina-proteassoma, GSTs, HE1 e lactoferrina (DACHEUX et al., 2012b).

Estudo comparativo com fluido epididimário de humanos, carneiros, suínos e garanhões identificou proteínas recorrentes entre as espécies, como alfa-1-antitripsina, alfa-2-glicoproteínas, clusterina, glutathione peroxidase, beta-N-acetil-hexosaminidase (Hex), lipocalina 5, lactoferrina, PDGS e prostaglandina D2 sintase. A clusterina destacou-se como a mais comum (DACHEUX et al., 2012a).

Os epididimossomos, além de proteínas, transportam RNAs mensageiros e microRNAs que modulam a expressão gênica espermática (DACHEUX et al., 2012a). Suas proteínas variam entre os segmentos e incluem proacrosina e galactosiltransferase (Galtase), envolvidas na modulação da reação acrossômica (GUYONNET et al., 2012). Também contêm lipocalinas e enzimas antioxidantes, que protegem contra o estresse oxidativo (KRIZANAC et al., 2024), bem como integrinas, que regulam a adesão celular entre o espermatozoide e o epitélio epididimário (MERC, FROLIKOVA e KOMRSKOVA, 2021).

Apesar da importância do proteoma epididimário, sua estrutura é altamente sensível à elevação da temperatura. Temperaturas elevadas podem inativar enzimas metabólicas e proteínas de transporte, comprometendo a fisiologia local (WANG et al., 2016). A desnaturação proteica favorece a formação de agregados insolúveis, afetando a homeostase celular (LEPOCK, 1997).

O acúmulo de proteínas danificadas causa uma hiperexpressão de ubiquitina e sobrecarga do sistema proteossomal, formando agregados citotóxicos nas células epididimárias (MARTÍN-VILLANUEVA et al., 2021). Como mecanismo compensatório, a autofagia é ativada; porém, sob alta demanda, entram em colapso, especialmente com a disfunção de proteínas com domínio Serpina, acarretando uma desregulação da atividade proteolítica e desequilíbrio entre síntese e degradação proteica (ZHANG et al., 2012; WILLOT et al., 2023).

Simultaneamente, o estresse térmico intensifica o processo inflamatório e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), agravando o estresse oxidativo e prejudicando as funções fisiológicas epididimárias (CHAUHAN et al., 2021). Em conjunto, esses processos comprometem a maturação espermática e reduzem a qualidade do sêmen e a fertilidade (DURAIRAJANAYAGAM, AGARWAL e ONG, 2015).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as pesquisas existentes forneçam informações valiosas sobre os efeitos do estresse térmico no proteoma epididimário de carneiros, ainda há lacunas significativas, especialmente, em relação ao entendimento das alterações proteômicas específicas no epidídimo de ovinos expostos a temperaturas extremas. A maioria dos estudos focou em aspectos fisiológicos, sem explorar detalhadamente os mecanismos moleculares e interações proteicas. Além disso, a variabilidade nos resultados observados em diferentes estudos pode indicar a necessidade de mais pesquisas que considerem diferentes condições ambientais, raças e estratégias de manejo.

A compreensão detalhada dos efeitos do estresse térmico no epidídimo e na fertilidade de carneiros pode oferecer novas oportunidades para o desenvolvimento de estratégias de mitigação dos efeitos do estresse térmico. As pesquisas futuras devem explorar mais profundamente a influência de fatores como a duração e a intensidade do estresse térmico, bem como investigar abordagens para restaurar o equilíbrio proteômico no epidídimo.

4. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipóteses

A hipótese levantada neste estudo é que o estresse térmico gerado pela insulação testicular influencia no perfil proteico da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de carneiros.

Objetivo geral e específico

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar o proteoma do epidídimo de carneiros submetidos à insulação testicular por 48 horas. Especificamente, o estudo visou identificar as proteínas diferencialmente abundantes nos segmentos cabeça, corpo e cauda do epidídimo de ovinos sob estresse térmico testicular; avaliar a dinâmica proteica nos diferentes momentos experimentais (controle, 24 e 48 horas de insulação escrotal, 7 e 14 dias após cessar o estresse térmico); e compreender os possíveis papéis biológicos e as interações funcionais dessas proteínas na resposta epididimária ao insulto térmico.

5. REFERÊNCIAS

- AL-MAGHREBI, M.; RENNO, W. M. The tACE/Angiotensin (1–7)/Mas Axis Protects Against Testicular Ischemia Reperfusion Injury. **Urology**, v. 94, p. 312.e1-312.e8, 1 ago. 2016.
- Alumot E, Lensky Y, Schindler H. Separation of proteins in the epididymal fluid of the ram. **J Reprod Fertil**. 1971 Jun;25(3):349-53. doi: 10.1530/jrf.0.0250349. PMID: 5579687.
- ARROTIA, K. *et al.* The Epididymis: Embryology, Structure, Function And Its Role In Fertilization And Infertility. *Em*: VIOLIN PEREIRA, L. (Ed.). **Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics**. [s.l.] InTech, 2012.
- BAGATH, M. *et al.* The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 126, p. 94–102, 1 out. 2019.
- BAUMGARTEN, H. G. *et al.* Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 90, n. 1, p. 81–95, 1 mar. 1968.
- BASKARAN, S.; PANNER SELVAM, M. K.; AGARWAL, A. Chapter Four - Exosomes of male reproduction. *Em*: MAKOWSKI, G. S. **Advances in Clinical Chemistry**. Elsevier, 2020. v. 95p. 149–163.
- BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. **Biology**, v. 9, n. 1, p. 21, 20 jan. 2020.
- BEN MOULA, A. *et al.* Heat stress and ram semen production and preservation: Exploring impacts and effective strategies. **Journal of Thermal Biology**, v. 119, p. 103794, jan. 2024.
- BERTOL, M. A. F. *et al.* Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p. 777–783, out. 2013.
- BIANCA, W. Heat tolerance in cattle-its concept, measurement and dependence on modifying factors. **International Journal of Biometeorology**, v. 5, n. 1, p. 5–30, 1 mar. 1961.

- BJÖRKGREN, I.; SIPILÄ, P. The impact of epididymal proteins on sperm function. **Reproduction**, v. 158, n. 5, p. R155–R167, nov. 2019.
- BORGES, T. J. *et al.* The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.
- BRIDGES, P. J.; BRUSIE, M. A.; FORTUNE, J. E. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 3, p. 508–522, out. 2005.
- BRITO, L. F. C. *et al.* Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 1–2, p. 1–15, nov. 2003.
- CAMEO, M. S.; BLAQUIER, J. A. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. **Journal of Endocrinology**, v. 69, n. 1, p. 47–55, abr. 1976.
- CANTET, J. M.; YU, Z.; RÍUS, A. G. Heat Stress-Mediated Activation of Immune–Inflammatory Pathways. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1285, nov. 2021.
- CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- β Superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 6, p. 787–823, 1 dez. 2002.
- CHASELING, G. K. *et al.* Extreme Heat and Cardiovascular Health: What a Cardiovascular Health Professional Should Know. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 37, n. 11, p. 1828–1836, 1 nov. 2021.
- CHAUHAN, S. S. *et al.* Impacts of heat stress on immune responses and oxidative stress in farm animals and nutritional strategies for amelioration. **International Journal of Biometeorology**, v. 65, n. 7, p. 1231–1244, 1 jul. 2021.
- CHEN, H.; ALVES, M. B. R.; BELLEANNÉE, C. Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. **Human Reproduction Update**, v. 28, n. 1, p. 51–66, 21 dez. 2021.
- CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. (EDS.). **Animal andrology: theories and applications**. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI, 2014.
- CLEMENT, P.; GIULIANO, F. Anatomy and physiology of genital organs – men. *Em: Handbook of Clinical Neurology*. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 130p. 19–37.
- CORNER, E. M.; SAWYER, J. E. H.; LANGLEY, J. N. A research into the heat regulation of the body by an investigation of death temperatures. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 73, n. 488–496, p. 361–375, 31 jul. 1904.
- CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 213, 8 jan. 2009.

COSENTINO, M. J. *et al.* Regulation of Rat Caput Epididymidis Contractility by Prostaglandins. **Journal of Andrology**, v. 5, n. 3, p. 216–222, 6 maio 1984.

COTTON, L. M.; O'BRYAN, M. K.; HINTON, B. T. Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 2, p. 193–216, 1 abr. 2008.

Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microsc Res Tech**. 2003 May 1;61(1):7-17. doi: 10.1002/jemt.10312. PMID: 12672118.

DACHEUX, J.-L. *et al.* The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 4, p. 197–210, ago. 2012a.

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F.; DRUART, X. Epididymal protein markers and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 76–87, jun. 2016.

DACHEUX, J.-L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. 1 fev. 2014.

DA SILVA, N.; SMITH, T. B. Exploring the role of mononuclear phagocytes in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 591, ago. 2015.

DE ANDRADE FERRAZZA, R. *et al.* Thermoregulatory responses of Holstein cows exposed to experimentally induced heat stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 66, p. 68–80, maio 2017.

DE MARTINO, C. *et al.* Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. **Cell and Tissue Research**, v. 196, n. 1, p. 1–22, jan. 1979.

DEPEIGES, A.; DUFAURE, J. P. Principais proteínas secretadas pelo epidídimo de *Lacerta vivipara*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 628, p. 109–115, 1 jan. 1980.

DUBÉ, E. *et al.* Epidermal growth factor regulates connexin 43 in the human epididymis: role of gap junctions in azoospermia. **Human Reproduction**, v. 27, n. 8, p. 2285–2296, 1 ago. 2012.

DURAIRAJANAYAGAM, D.; AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 14–27, jan. 2015.

EVANS, T. J.; GANJAM, V. K. Chapter 2 - Reproductive Anatomy and Physiology. *Em:* GUPTA, R. C. (Ed.). . **Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 7–37.

ERIKSON, D. W. *et al.* Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, v. 133, n. 5, p. 909–917, mai 2007.

- Fernandez A, Pérez, S.S, Villagrà A, Pérez, V. N, Astiz S. The Effect of Stress on Reproduction and Reproductive Technologies in Beef Cattle—A Review. **Animals**. 2020; 10(11):2096.
- FERREIRA, J. C. P. *et al.* Impactos do estresse térmico na reprodução de fêmeas bovinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 583–589, 2021.
- FEUGANG, J. M. *et al.* Profiling of relaxin and its receptor proteins in boar reproductive tissues and spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 46, 20 maio 2015.
- FURTADO, D. A. *et al.* Ingestive behavior of Santa Inês sheep under thermoneutrality and thermal stress upon consumption of saline water. **Engenharia Agrícola**, v. 41, n. 1, p. 19–24, fev. 2021.
- FRITZ, I. B. *et al.* Ram Rete Testis Fluid Contains a Protein (Clusterin) Which Influences Cell-Cell Interactions in Vitro1. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1173–1188, 1 jun. 1983.
- GALÁN, E. *et al.* A systematic review of non-productivity-related animal-based indicators of heat stress resilience in dairy cattle. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206520, 1 nov. 2018.
- GARCIA, A. R. *et al.* Estresse calórico e reprodução em ovinos: fundamentos e perspectivas tecnológicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 430–442, 2021.
- GATTI, J.-L. *et al.* A 105- to 94-Kilodalton Protein in the Epididymal Fluids of Domestic Mammals Is Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE); Evidence That Sperm Are the Source of This ACE1. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 4, p. 937–945, 1 abr. 1999.
- GERENA, R. L. *et al.* Identification of a Fertility-Associated Protein in Bull Seminal Plasma As Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase1. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 826–833, 1 mar. 1998.
- GREGORY, M.; CYR, D. G. Effects of prostaglandin E2 on gap junction protein alpha 1 in the rat epididymis†. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 1, p. 123–132, 1 jan. 2019.
- GRIFFETH, RICHARD J.; BIANDA, V.; NEF, S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. **Basic and Clinical Andrology**, v. 24, n. 1, p. 12, 18 ago. 2014.
- GRIFFETH, RICHARD J; BIANDA, V.; NEF, S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. **Basic and Clinical Andrology**, v. 24, n. 1, p. 12, dez. 2014.
- GUJAR, G. *et al.* Heat stress adaptation in cows – Physiological responses and underlying molecular mechanisms. **Journal of Thermal Biology**, v. 118, p. 103740, 1 dez. 2023.
- GUYONNET, B. *et al.* Isolation and Proteomic Characterization of the Mouse Sperm Acrosomal Matrix. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 758–774, set. 2012.
- HAMILTON, T. R. S. *et al.* Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 1687657, 2016.

- HASI, G. *et al.* Differential expression and localisation of heat shock protein 70 (HSP70) and glutathione peroxidase 5 (GPX5) in the testis and epididymis of Sonid Bactrian camels. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 35, n. 10, p. 552–562, 9 jun. 2023.
- HEDGER, M. P. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 625–640, 2011.
- HELED, Y.; FLEISCHMANN, C.; EPSTEIN, Y. Cytokines and their role in hyperthermia and heat stroke. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 85–96, 1 maio 2013.
- HENLE, G.; ZITTLE, C. A. Studies of the metabolism of bovine epididymal spermatozoa. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 136, n. 1, p. 70–78, 1 mar. 1942.
- Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**. 2001 Oct;122(4):519-26. doi: 10.1530/rep.0.1220519. PMID: 11570958.
- HOFMAN, W. F.; RIEGLE, G. D. Thermo-respiratory responses of shorn and unshorn sheep to mild heat stress. **Respiration Physiology**, v. 30, n. 3, p. 327–338, ago. 1977.
- HOPPER, R. M. **Bovine Reproduction**. 2nd ed ed. Newark: John Wiley & Sons, Incorporated, 2021.
- HOSSEINI, Z.; GHOLAMI, M.; BONYADI, Z. Impact of Climate Change on Human Health. **Iranian biomedical journal**, 1 dez. 2024.
- HUANG, Y. *et al.* Anatomical Transcriptome Atlas of the Male Mouse Reproductive System During Aging. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 8 fev. 2022.
- HYDER, I. *et al.* Thermotolerance in Domestic Ruminants: A HSP70 Perspective. *Em*: ASEA, A. A. A.; KAUR, P. (Eds.). . **Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences**. Heat Shock Proteins. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 12p. 3–35.
- IVELL, R.; AGOULNIK, A. I.; ANAND-IVELL, R. Relaxin-like peptides in male reproduction – a human perspective. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 10, p. 990–1001, 1 maio 2017.
- JAFARI, M. J. *et al.* Relationship between heat stress exposure and some immunological parameters among foundry workers. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, n. 5, p. 853–861, 1 maio 2020.
- JAMES, E. R. *et al.* The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5377, 29 jul. 2020.
- JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 207–217, 1 fev. 2011.
- KAISER, R. *et al.* The Effect of the 1995 Heat Wave in Chicago on All-Cause and Cause-Specific Mortality. **American Journal of Public Health**, v. 97, n. Suppl 1, p. S158–S162, abr. 2007.

- KASTELIC, J. P. *et al.* Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, p. 935–942, 1996.
- KASTELIC, J. P. Understanding and evaluating bovine testes. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 18–23, jan. 2014.
- KASTELIC, J. P. *et al.* Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. **Veterinární medicína**, v. 62, n. 8, p. 437–442, 31 ago. 2017.
- KASTELIC, John Patrick *et al.* Pathogenesis and mitigation of the deleterious effects of heat stress on bull reproduction. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 518–524, 2021.
- KHALIMOVA, Y. S. Features of Sperm Development: Spermatogenesis and Fertilization. **American Journal of Bioscience and Clinical Integrity**, v. 1, n. 11, p. 90–98, 20 nov. 2024.
- KOHANE, A. C. *et al.* Distribution and Site of Production of Specific Proteins in the Rat Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 181–187, 1 ago. 1980.
- KOHANE, ADRIANA C. *et al.* Interaction of Proteins of Epididymal Origin with Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 737–742, 1 out. 1980.
- KOHSAKA, T. *et al.* Efficacy of relaxin for cisplatin-induced testicular dysfunction and epididymal spermatotoxicity. **Basic and Clinical Andrology**, v. 30, n. 1, p. 3, 9 mar. 2020.
- KONIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 4ª edição ed. Porto Alegre - RS: Artimed, 2011.
- KORMANO, M.; REIJONEN, K. Microvascular structure of the human epididymis. **American Journal of Anatomy**, v. 145, n. 1, p. 23–31, jan. 1976.
- KOSKIMIES, A. I.; KORMANO, M. Proteins in fluids from different segments of the rat epididymis. **Reproduction**, v. 43, n. 2, p. 345–348, 1 maio 1975.
- KRIZANAC, M. *et al.* Overview of the expression patterns and roles of Lipocalin 2 in the reproductive system. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, 5 abr. 2024.
- LEPOCK, J. R. Protein Denaturation During Heat Shock. *Em: Advances in Molecular and Cell Biology*. [s.l.] Elsevier, 1997. v. 19p. 223–259.
- LI, L. *et al.* Upregulation of heat shock protein 32 in Sertoli cells alleviates the impairments caused by heat shock-induced apoptosis in mouse testis. **Cell Stress and Chaperones**, v. 18, n. 3, p. 333–351, maio 2013.
- LI, T. *et al.* Identification and Functional Assignment of Genes Implicated in Sperm Maturation of Tibetan Sheep. **Animals**, v. 13, n. 9, p. 1553, jan. 2023.
- LI, Z. *et al.* The Potential Role of Exercise-Induced Muscle Damage in Exertional Heat Stroke. **Sports Medicine**, v. 51, n. 5, p. 863–872, 1 maio 2021.

- LIU, X. *et al.* Inhibition of Prolactin Affects Epididymal Morphology by Decreasing the Secretion of Estradiol in Cashmere Bucks. **Animals**, v. 14, n. 12, p. 1778, jan. 2024.
- LIU, Y.; WANG, D.-K.; CHEN, L.-M. The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 4, 1 abr. 2012.
- LIU, J. *et al.* Antioxidant properties and transcriptome of cauda epididymis with different levels of fertility in Hu lambs. **Theriogenology**, v. 182, p. 85–95, 1 abr. 2022.
- MACMILLAN, E. W. Higher Epididymal Obstructions in Male Infertility: Etiology and Treatment. **Fertility and Sterility**, v. 4, n. 2, p. 101–127, mar. 1953.
- MACMILLAN, E. W. The Blood Supply Of The Epididymis In Man. **British Journal of Urology**, v. 26, n. 1, p. 60–71, mar. 1954.
- MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 20 abr. 2017.
- McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res.** 2000 Dec 15;886(1-2):172-189. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02950-4. PMID: 11119695.
- MCEWEN, Bruce S. Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 840, n. 1, p. 33–44, 1998.
- MCMANUS, C. M. *et al.* Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? **Theriogenology**, v. 155, p. 157–167, out. 2020.
- MARTÍN-VILLANUEVA, S. *et al.* Ubiquitin and ubiquitin-like proteins and domains in ribosome production and function: Chance or necessity? **International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , maio 2021.
- MERC, V.; FROLIKOVA, M.; KOMRSKOVA, K. Role of Integrins in Sperm Activation and Fertilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11809, jan. 2021.
- MÉTAYER, S. *et al.* Comparison, Characterization, and Identification of Proteases and Protease Inhibitors in Epididymal Fluids of Domestic Mammals. Matrix Metalloproteinases Are Major Fluid Gelatinases1. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1219–1229, 1 maio 2002.
- MIEUSSET, R. *et al.* Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. **Journals of Reproduction e Fertility**, v. 94, p. 337–343, 1992.
- MINSON, C. T. *et al.* Age alters the cardiovascular response to direct passive heating. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1323–1332, 1 abr. 1998.
- MOREIRA, E. P.; MOURA, A. D. A. A.; ARAÚJO, A. A. D. Efeitos da Insulação Escrotal sobre a Biometria Testicular e Parâmetros Seminais em Carneiros da Raça Santa Inês Criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1704–1711, dez. 2001.

- MOSELEY, P. L. Heat Shock Proteins and the Inflammatory Response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n. 1, p. 206–213, 1 set. 1998.
- MOSTAFA, T. *et al.* Human testicular arterial supply: gross anatomy, corrosion cast, and radiologic study. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 6, p. 2226–2230, 1 dez. 2008.
- NASHAN, D. *et al.* Immuno-competent cells in the murine epididymis. **International Journal of Andrology**, v. 12, n. 1, p. 85–94, 1989.
- NDLOVU, N.; CHUNGAG, B. N. Impact of heat stress on cardiovascular health outcomes of older adults: A mini review. **Aging and Health Research**, v. 4, n. 2, p. 100189, 1 jun. 2024.
- NEMATI, M. H. *et al.* Immune response of broilers to vitamin C and coenzyme Q10 under cold stress condition. **Journal of Animal Production, Print ISSN: 2008-6776., Online ISSN: 2382-994X**, v. 15, n. 1, p. 45–53, 22 jun. 2013.
- NIEMAN, D. C. *et al.* The effects of acute moderate exercise on leukocyte and lymphocyte subpopulations. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 23, n. 5, p. 578–585, 1991.
- O'FLAHERTY, C. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. **Andrology**, v. 7, n. 5, p. 662–668, 2019a.
- PAUL, N. *et al.* Epididymosomes: A potential male fertility influencer. **Andrology**, v. 53, n. 9, p. e14155, 2021.
- PARK, Yoo Jin; PANG, Myung Geol. Mitochondrial functionality in male fertility: From spermatogenesis to fertilization. **Antioxidants MDPI**, 1 jan. 2021.
- PIERUCCI-ALVES, F. *et al.* Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to Sperm in the Epididymis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1882, 16 ago. 2018.
- PRASAD, M. R. N.; RAJALAKSHMI, M. Comparative physiology of the mammalian epididymis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 28, n. 4, p. 530–537, 1 abr. 1976.
- RAJALAKSHMI, M. Physiology of the epididymis and spermatozoa. **Journal of Biosciences**, v. 7, n. 2, p. 191–195, 1 mar. 1985.
- RIZZOTO, G. *et al.* Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. **Theriogenology**, v. 152, p. 64–68, ago. 2020.
- RIZZOTO, G.; KASTELIC, J. P. A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants? **Theriogenology**, v. 147, p. 166–175, abr. 2020.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The epididymis. *Em: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. [s.l.] Elsevier Inc., 2006. p. 1071–1148.
- ROCHA, D. R.; MARTINS, J. A. M.; VAN TILBURG, M. F.; *et al.* Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1291–1305, nov. 2015.

ROSSITTO, M. *et al.* Multiple roles of the prostaglandin D2 signaling pathway in reproduction. **REPRODUCTION**, v. 149, n. 1, p. R49–R58, jan. 2015.

ROTH, Z. *et al.* Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 1, p. 83–90, set. 2000.

ROTH, Z. Reproductive physiology and endocrinology responses of cows exposed to environmental heat stress - Experiences from the past and lessons for the present. **Theriogenology**, v. 155, p. 150–156, out. 2020.

SAFA, S. *et al.* Heat stress abatement during the postpartum period: effects on whole lactation milk yield, indicators of metabolic status, inflammatory cytokines, and biomarkers of the oxidative stress. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 1, p. 122–132, 1 jan. 2019.

SANTOS, M. M. DOS *et al.* An updated review on cattle thermoregulation: physiological responses, biophysical mechanisms, and heat stress alleviation pathways. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 24, p. 30471–30485, 1 jun. 2021.

SELYE, Hans. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4667, p. 1383–1392, 17 jun. 1950. Acesso em: 4 out. 2021.

SHEPHARD, R.; MALONEY, S. A review of thermal stress in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 101, n. 11, p. 417–429, 2023.

SOLEILHAVOUP, C. *et al.* Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v. 109, p. 245–260, set. 2014.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E. H.; MAHGOUB, O. Effect of heat stress on respiratory rate, rectal temperature and blood chemistry in Omani and Australian Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 2, p. 193–198, 1 ago. 2003.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **REPRODUCTION**, v. 146, n. 1, p. R21–R35, jul. 2013.

SULLIVAN, R.; BELLEANNÉE, C. Cell Biology of the Epididymis. *Em: Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, 2018. p. 286–291.

SULLIVAN, R.; MIEUSSET, R. The human epididymis: Its function in sperm maturation. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 5, p. 574–587, set. 2016.

SULLIVAN, R. *et al.* Revisiting structure/functions of the human epididymis. **Andrology**, v. 7, n. 5, p. 748–757, 2019.

TABECKA, L. A. *et al.* Expressão sazonal do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), seu receptor IGF-1R e klotho em testículos e epidídimos do bisão europeu (*Bison bonasus*, *Linnaeus 1758*). **Theriogenology**, v. 126, p. 199–205, 1 mar. 2019.

- Talbott, John Harold, H. T. Edwards, David Bruce Dill and L. Drastich. "Physiological Responses to High Environmental Temperature." **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 13 (1933): 381-397.
- TEIXEIRA, M. B. *et al.* Heat stress induced by testicular insulation for 24 or 48 h rapidly impairs epididymal sperm quality and reduces spermatogenesis in rams. **Small Ruminant Research**, v. 243, p. 107443, 1 fev. 2025.
- TOMSIG, J. L.; TURNER, T. T. Growth Factors and the Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 3, p. 348–357, 6 maio 2006.
- TSO, E. C.-F.; LACY, D. Effects Of Prostaglandin F2 α On The Reproductive System Of The Male Rat. **Reproduction**, v. 44, n. 3, p. 545–550, 1975.
- TURNER, T. T. Resorption versus secretion in the rat epididymis. **Journals of Reproduction & Fertility Ltd**, v. 72, p. 509–514, 1984.
- VIANA NETO, A. M. *et al.* Sperm traits and seminal plasma proteome of locally adapted hairy rams subjected to intermittent scrotal insulation. **Animal Reproduction Science**, v. 263, p. 107439, abr. 2024.
- VOISIN, A. *et al.* Differential expression and localisation of TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 995, 22 jan. 2020.
- WANG, X. *et al.* Comparative proteomic analysis of heat stress proteins associated with rat sperm maturation. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 4, p. 3547–3552, 1 abr. 2016.
- WARK, J. D.; KUHAR, C. W.; LUKAS, K. E. Behavioral thermoregulation in a group of zoo-housed colobus monkeys (*Colobus guereza*). **Zoo Biology**, v. 33, n. 4, p. 257–266, 2014.
- WILLOT, Q. *et al.* Exploring the connection between autophagy and heat-stress tolerance in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 290, n. 2006, p. 20231305, 13 set. 2023.
- WINSLOW, C.-E. A.; GAGGE, A. P. Influence Of Physical Work On Physiological Reactions To The Thermal Environment. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 134, n. 3, p. 664–681, 30 set. 1941.
- XIA, Y. *et al.* GYY4137 a H₂S donor, attenuates ipsilateral epididymis injury in experimentally varicocele-induced rats via activation of the PI3K/Akt pathway. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 7, p. 729–735, jul. 2019.
- YOUNG, W. C. A Study of the Function of the Epididymis: III. Functional Changes Undergone by Spermatozoa During Their Passage Through the Epididymis and Vas Deferens in the Guinea-Pig. **The Journal of Experimental Biology**, 1 abr. 1931.
- ZHA, H. The impacts of global warming on animals and their response to climate warming. **Highlights in Science, Engineering and Technology**, v. 69, p. 552–560, 6 nov. 2023.
- ZHANG, M. *et al.* Autophagy and Apoptosis Act as Partners to Induce Germ Cell Death after Heat Stress in Mice. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41412, 25 jul. 2012.

ZHAO, J. *et al.* Anatomic characteristics of epididymis based on histology, proteomic, and 3D reconstruction. **Andrology**, v. 8, n. 6, p. 1787–1794, 2020.

ZHARANI, M. M. A. *et al.* Use of Lactoferrin Supplement as an Efficient Antioxidant to Ameliorate the Effects of Mercury-induced Oxidative Stress in Male Wistar Rats. **Biomedical and Biotechnology Research Journal**, v. 8, n. 1, p. 45–52, mar. 2024.

ZHOU, W. *et al.* Mechanisms of tethering and cargo transfer during epididymosome-sperm interactions. **BMC Biology**, v. 17, p. 35, 18 abr. 2019.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Epididymal proteome of sheep under heat stress

Proteoma epididimário de ovinos sob estresse térmico

Cunha. R. A.^a; Henry David Mogollón García^a, Pedro H.C. Martins^a, Antônio Guilherme Roncada Pupulim^a, Paula Zanin Rates^a, Guilherme Rizzoto^a, John Patrick Kastelic^b, Fabiana Ferreira de Souza^a, Ramanathan Kasimanickam^c, João Carlos Pinheiro Ferreira^{a*}.

^aDepartment of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, Brazil.

^bFaculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada.

^cCollege of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, USA.

*Autor correspondente: João Carlos Pinheiro Ferreira

E-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br

Abstract

31

32 Climate change is increasing the frequency and intensity of heatwaves, exposing ruminants
33 to heat stress (HS), which can cause severe damage to the endocrine system, gamete
34 viability, and pregnancy outcomes in these species. This study investigated the epididymal
35 proteome in 25 rams subjected to up to 48 hours of testicular heat stress induced by scrotal
36 insulation. The animals were divided into five groups (n = 5): control (no heat stress), 24 h,
37 48 h, 7 days, and 14 days. Scrotal insulation was performed in all groups, except in the
38 control using disposable diapers covering the scrotal sac, and the animals were castrated at
39 each time point (day zero = day of start of insulation) using the open orchiectomy technique.
40 Samples from the caput, corpus, and cauda of the epididymis were analyzed by
41 electrophoresis and mass spectrometry. A total of 528 proteins were identified across the
42 caput, corpus, and cauda regions. The differentially abundant proteins (DAPs) included 50
43 in the caput, 33 in the corpus, and 39 in the cauda ($P < 0.05$). VIP Score analysis highlighted
44 the 15 most relevant DAPs per segment and their expression profiles at 24 and 48 hours of
45 insulation and 7 and 14 days after scrotal insulation. Gene ontology and protein–protein
46 interaction analyses indicated that the epididymis initially activates protective mechanisms
47 during the 24 h and 48 h time points. After stress cessation, proteins involved in cellular and
48 tissue repair increased in abundance at 7 and 14 days, contributing to the recovery of heat-
49 induced damage. These findings demonstrate that heat stress alters the epididymal proteome,
50 affecting pathways critical for male fertility. Understanding these epididymal proteomic
51 changes provides insights into the biological responses to heat stress and highlights the
52 importance of management strategies to mitigate reproductive losses in ruminants exposed
53 to high temperatures.

54

55 **Keywords:** Proteins, epididymis, rams, heat stress.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70 1. Introduction

71 Climate change raises concerns about potential increases in global temperatures and
72 the occurrence of heatwaves, which trigger heat stress in animals. The effect of heat stress
73 (HS) on ruminant homeostasis is complex and may result in hyperthermia, endocrine
74 imbalances, loss of male gamete viability [1–3].

75 The male gonads in rams are located externally in the scrotum, a pendulous structure
76 crucial for testicular thermoregulation [4]. To ensure proper spermatogenesis and function,
77 the testes must be maintained 3–5 °C below body temperature. Any increase beyond this
78 range can impair spermatogenesis and reduce male fertility [5]. Interestingly, there is clear
79 evidence that epididymis can also be severely impacted by HS exposure. The epididymis
80 plays a crucial role in sperm transport, maturation, concentration, and protection [6–8]. In a
81 recent study of our research group, we observed a significant impairment in the overall
82 quality of epididymal ovine sperm collected post acute-scrotal insulation (SI) [9].

83 Unfortunately, there is a lack of information regarding the proteome of the
84 epididymis and its distinct sections (caput, corpus, and cauda) in rams, not to mention the
85 effects of HS exposure on the organ. Among the few available reports, it is indicated that
86 HS alters the epididymal fluid and environment, leading to pH variations and excessive
87 production of reactive oxygen species (ROS) [10].

88 This lack of detailed information hinders a deeper understanding of the functional
89 and molecular differences between these regions of the epididymis in response to HS.
90 Further understanding is crucial for developing strategies aimed at alleviating the detrimental
91 effects of HS on the reproduction of sheep, particularly in males. Therefore, our hypothesis
92 was that HS impairs negatively and distinctively the function of different sections of the
93 epididymis and leads to proteome modulation, whereas our objective was to study the
94 proteome of the ovine epididymal sections (caput, corpus, and cauda) subjected to testicular
95 HS induced by SI.

96 97 2. Material and methods

98 99 2.1. Ethical statement

100 This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the
101 Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP-Botucatu (permit number

102 041/2021) and performed in the Department of Veterinary Surgery and Animal
103 Reproduction - FMVZ - UNESP.

104

105 **2.2. Animals**

106 Healthy adult crossbred rams (n = 25; Santa Inês x Dorper ~1.5 years old and ~40 kg
107 of live weight) were used. Males were selected based on clinical and andrological
108 evaluations, and only those presenting total sperm motility (TM) > 75%, and normal sperm
109 morphology > 90% were used.

110 The animals were kept in stalls, provided with *ad libitum* water, and fed twice daily
111 with Tifton 85 grass hay (*Cynodon* spp.) along with commercial concentrate to meet their
112 maintenance metabolic needs (NRC, 2007).

113

114 **2.2 Scrotal insulation**

115 The rams were randomly allocated into five groups (n = 5/group): Control (no
116 insulation), 24H (24 h of SI followed by immediate castration), 48H (48 h of SI followed by
117 immediate castration), 7D (48 h of SI followed by castration on day 7 , with D0 being the start
118 of SI), and 14D (48 h of SI followed by castration on D14).To perform SI, two layers of
119 disposable baby diapers were placed on the scrotal neck and scrotum, as previously described
120 [10,12]. Immediately after SI, the testicular surface temperature was measured using a
121 thermographic camera (FLIR Modelo E53 24°, MSX®, Wilsonville, OR, USA) as described
122 Teixeira et al., [10]; the thermograms were then compared with the images obtained
123 immediately before SI.

124

125 **2.3 Surgical procedures and sampling**

126 To obtain epididymal samples, the rams were castrated using a semi-open orchietomy
127 technique. Preoperatively, 40,000 IU/kg benzathine penicillin G (i.m., Pentabiótico®
128 1,200,000 IU, Zoetis, São Paulo, Brazil), 2.2 mg/kg of flunixin meglumine (i.m., Flunixin®,
129 Chemitec, São Paulo, Brazil), and 0.2 mg/kg acepromazine (i.v., Apromazin 1%®, Syntec,
130 Santana de Parnaíba , Brazil) were administered. After 15 min, local anesthesia was provided
131 by administering 20 mL of 2% lidocaine with epinephrine (Lidovet®, Bravet, Rio de Janeiro,
132 Brazil), distributed as 5 mL in each spermatic cord and 10 mL at the site of the scrotal incision.

133 Surgical antisepsis of the scrotum was then performed, followed by the orchiectomy
134 procedure.

135 Immediately after castration, the epididymides were isolated from the testes and washed
136 in warm saline (37 °C). Fragments of the caput, corpus, and cauda were collected, placed in
137 cryogenic tubes, and stored at -80 °C until further processing.

138

139 **2.4 Analysis of epididymal protein profile**

140 Epididymal samples weighing 0.3 g were measured using a precision balance (Shimadzu®
141 AUY22) and placed in 2 mL tubes. Subsequently, RIPA buffer solution containing protease
142 inhibitors was added at a 0.3/500 µL ratio. The buffer consisted of 150 mmol NaCl, 1% Triton
143 X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.8 mmol EDTA, 1.0 µg/mL aprotinin, 1.0
144 µg/mL leupeptin, and 35.0 µg/mL PMSF in 50 mmol TRIS-HCl at pH 7.2. The samples were
145 then stored at -80 °C.

146 After thawing in an ice bath (0 °C), samples were subjected to three series of sonication
147 (30 s each; BRANSON - Digital Sonifier®) to solubilize the proteins, using a 3 mm probe at
148 an amplitude of 20% with 1-min intervals between series. Subsequently, the samples were
149 centrifuged (Eppendorf® - Centrifuge 5810 R) for 30 min at 10,000 g at 4 °C, and the
150 supernatant was transferred to a 1.5 mL tube and maintained in an ice bath. The protein
151 concentration was measured using the NanoDrop (Thermo Scientific - NanoDrop™
152 One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer – Madison, USA), programmed to
153 measure proteins at A280.

154 An aliquot containing 50 µg of protein was prepared for electrophoresis, and the run was
155 stopped once the sample entered the separating gel. The gel was stained with colloidal
156 coomassie, and the bands were excised for in-gel digestion. To digest the proteins, the excised
157 bands were destained three times with a solution of 50% acetonitrile in 25 mmol ammonium
158 bicarbonate and then dehydrated with 100% acetonitrile for 10 min. After removing the
159 acetonitrile, the residues were evaporated at room temperature in a fume hood for 15 min.
160 Disulfide bridges were reduced using 20 mmol dithiothreitol (DTT) in 50 mmol ammonium
161 bicarbonate at 56°C for 40 min. The DTT was then removed, and the gel fragments were
162 dehydrated again with 100% acetonitrile.

163 Following reduction, alkylation of the gel fragments was performed immediately using
164 55 mmol iodoacetamide in 50 mmol ammonium bicarbonate, incubated in the dark at room

165 temperature for 30 min. After removing the iodoacetamide solution, the gel fragments were
166 washed with 25 mmol ammonium bicarbonate and dehydrated twice with 100% acetonitrile.
167 The fragments were then left at room temperature in a fume hood for 15-20 min to evaporate
168 any residual acetonitrile

169 Digestion was carried out using 15 μL of trypsin solution (20 ng/ μL ; Sequencing Grade
170 Modified Trypsin, Promega Biotecnologia do Brasil LTDA). The samples were chilled at 4
171 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min to allow the trypsin to penetrate the gel fragments, followed by the addition of
172 50 mmol ammonium bicarbonate and incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 14 h. After digestion, peptides
173 were eluted by adding 15 μL of blocking solution (5% formic acid in 50% acetonitrile). Three
174 rounds of elution were performed: first, with 1% formic acid in 60% methanol at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 15
175 min, followed by 1% formic acid in 50% acetonitrile for the same time and temperature, and
176 finally, with 100% acetonitrile to dehydrate the gel fragments.

177 The supernatant from each elution was pooled, and the sample was concentrated under
178 vacuum (SPD1010 Integrated SpeedVacTM Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,
179 MA, USA).

180 The samples were eluted in 10 μL of 0.1% trifluoroacetic acid (v/v) in water and desalted
181 using a Reversed-Phase ZipTip C18 (P10, Millipore, cat# ZTC18S960, Millipore Corporation,
182 Merck KGaA, Darmstadt, Germany). After desalting, the samples were transferred to vials
183 (Waters Total Recovery Vial, Part No. 186000385c, Waters Technologies do Brasil Ltda) for
184 mass spectrometry analysis. The peptide mixture was resuspended in 20 mmol ammonium
185 formate, pH 10.

186 The analyses were performed at the National Center for Research in Energy and Materials
187 (CNPEM - Campinas, SP, Brazil), using a nanoElute nanoflow chromatography system
188 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) coupled to a timsTOF Pro hybrid mass spectrometer
189 with ion mobility spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A 1 μL aliquot
190 containing 200 ng of digested peptides was injected into a FIFTEEN C18 column (1.9 μm ,
191 150 mm \times 75 μm). A reverse-phase gradient (solvent A: 0.1% formic acid in water; solvent
192 B: 0.1% formic acid in acetonitrile) was applied to the nanoflow chromatography system at a
193 flow rate of 500 nL/min, with the column temperature maintained at 50 $^{\circ}\text{C}$. The
194 chromatographic run lasted 60 min (2% to 30% of solvent B over 55 min; increased to 95%
195 at 56 min; held at 95% for an additional 4 min).

196 The column was coupled online to a timsTOF-Pro mass spectrometer equipped with a
197 CaptiveSpray ion source (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The capillary ion
198 transfer line was maintained at 180 °C. Ion accumulation lasted 123 ms, and mobility
199 separation was achieved using an input potential ramp from -160 V to -20 V over 123 s.
200 During acquisition, the PASEF method was enabled by accumulating precursor ion
201 fragmentation data along with m/z and mobility information, obtained from a full-scan
202 timsTOF-MS experiment with an m/z range of 100 to 1,700. Monocharged precursors were
203 excluded based on their position in the m/z-ion mobility plane, and any precursors reaching
204 the target value of 20,000 a.u. were dynamically excluded for 0.4 min. The timsTOF-MS and
205 PASEF® modes were controlled and synchronized using the Bruker Daltonik OtofControl 5.1
206 instrument control software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

207

208 **2.5 Identification and characterization of differentially abundant proteins**

209 Differentially abundant proteins (DAPs) were identified and functionally
210 characterized using the UniProt database (<https://www.uniprot.org/>). Accession numbers
211 corresponding to proteins previously identified by mass spectrometry were used as unique
212 identifiers to ensure accurate retrieval of protein information. Searches were restricted to the
213 species *Ovis aries* (domestic sheep). For each protein, relevant data such as protein name and
214 associated gene were retrieved.

215

216 **2.6 Statistical analysis**

217 Proteins that showed a value of zero in more than 50% of the samples of all experimental
218 experimental groups (Con, 24H, 48H, 7D, and 14D) were excluded from the statistical
219 analysis to avoid potential distortions in the results. MetaboAnalyst 6.0 software
220 (www.metaboanalyst.ca) was used for univariate (ANOVA) and multivariate analysis, using
221 principal component analysis (PLSDA), based on variable importance in the projection (VIP
222 score). Using hierarchical clustering, PCA was used to describe the protein clusters in the
223 analyzed fragment. The results found in the VIP score (cutoff $\alpha > 1.5$) were compared with
224 the results of ANOVA followed by Fisher's test. Differentially abundant proteins with FDR <
225 0.05 were considered.

226

227 2.7 Gene ontology

228 Gene ontology (GO) analysis was performed based on the genes corresponding to the DAPs
229 identified between the experimental groups. For functional enrichment analysis, the genes were
230 submitted to the ShinyGO platform (www.bioinformatics.sdstate.edu/go/) with the species *Ovis*
231 *aries* selected. Gene ontology (GO) analysis was performed based on the genes corresponding
232 to the differentially abundant proteins (DAPs) identified among the experimental groups. For
233 functional enrichment analysis, the genes were submitted to the ShinyGO platform
234 (www.bioinformatics.sdstate.edu/go/), selecting the species *Ovis aries*. Gene ontology (GO)
235 analysis was performed based on the genes corresponding to the differentially abundant proteins
236 (DAPs) identified among the experimental groups. For functional enrichment analysis, the
237 genes were submitted to the ShinyGO platform (www.bioinformatics.sdstate.edu/go/),
238 selecting the species *Ovis aries*.

239 The GO results were displayed using a SANKEY plot, generated through the Srplot
240 platform (<https://www.bioinformatics.com.cn/srplot>).

241 Protein–protein interaction (PPI) networks were generated using the STRING platform
242 (www.string-db.org), also based on the DAP-associated genes, with *Ovis aries specified* for the
243 inference of biological interactions. Interactions with a confidence score ≥ 0.400 were
244 considered significant.

245

246 3 Results

247 Rams subjected to 24 and 48 h of SI had higher scrotal surface temperatures (~ 35 °C)
248 compared to those from the control group at the end of SI (30.23 ± 2.3 °C).

249 Proteomic analysis identified 63, 46, and 47 proteins in the caput, corpus, and cauda
250 regions, respectively. Of these, 50 (Caput), 33 (Corpus), and 39 (Cauda) were differentially
251 abundant (DAPs; FDR < 0.05) when each treated group (24H, 48H, 7D, 14D) was compared
252 with the Control group. The complete list of DAPs in epididymal caput, corpus, and cauda is
253 shown, respectively, in Supplementary Tables 1–3.

254 The PLS-DA analysis revealed differences in the proteome among the regions of the
255 epididymis and between the experimental groups. In the caput, a clear separation of the 14-day
256 group was observed, while the control, 24 h, 48 h, and 7 day groups showed partial overlap,
257 indicating progressive biological variations throughout the experimental period. In the corpus
258 region, an overlap among all groups was observed at every time point; however, at 7 and 14 days,

259 four animals exhibited distinct proteomic profiles, without overlapping with the other groups. In
 260 the cauda, the 14 day group displayed a unique proteomic profile, whereas the other groups
 261 showed some degree of proteomic convergence, suggesting a distinct epididymal response during
 262 the late phases following heat stress (Fig. 1).

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

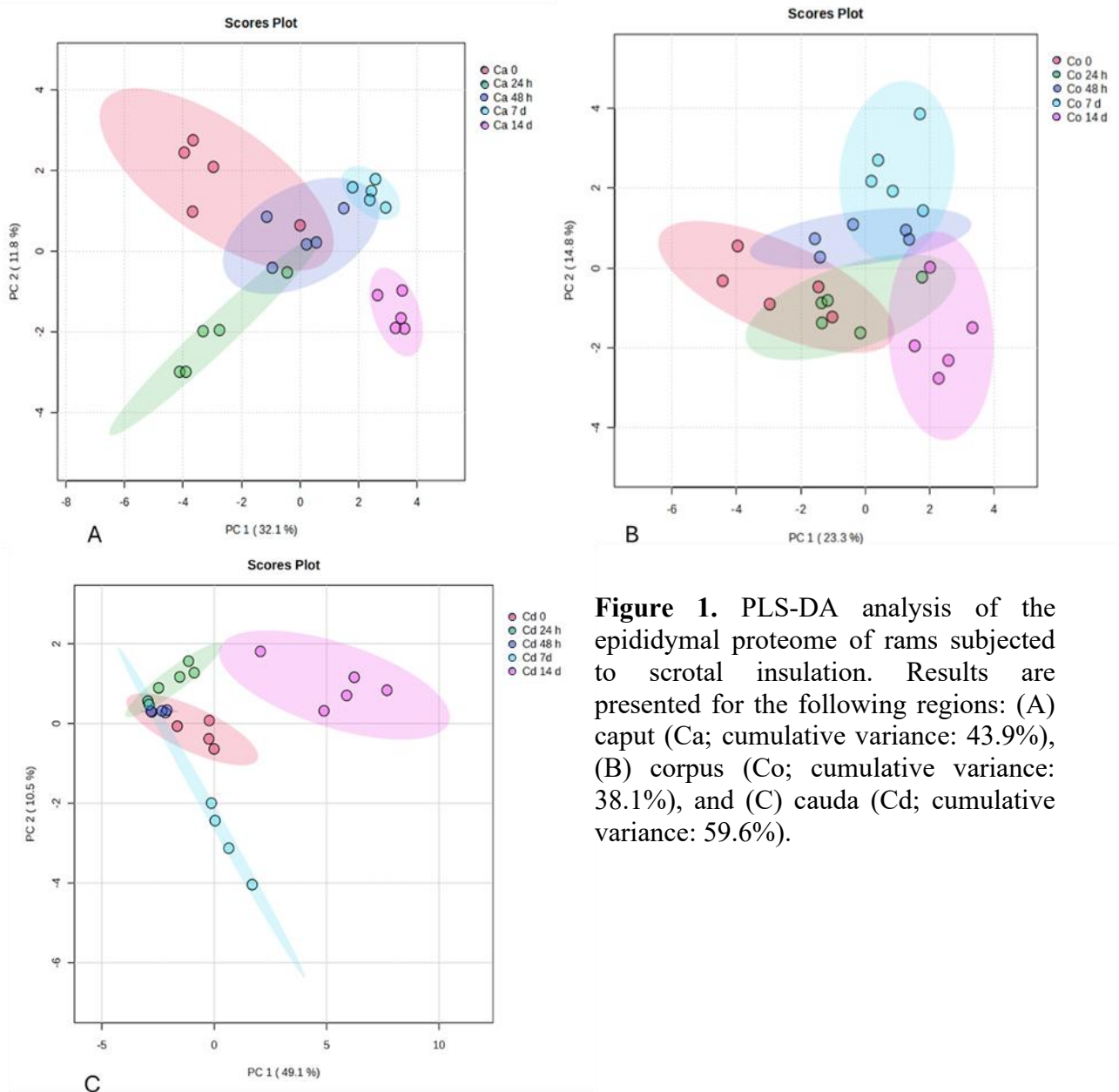


Figure 1. PLS-DA analysis of the epididymal proteome of rams subjected to scrotal insulation. Results are presented for the following regions: (A) caput (Ca; cumulative variance: 43.9%), (B) corpus (Co; cumulative variance: 38.1%), and (C) cauda (Cd; cumulative variance: 59.6%).

299 The VIP score analysis (threshold ≥ 1.0) identified the top 15 differentially abundant
 300 proteins (DAPs) across the different epididymal regions (Fig. 2A, B, and C). The full names
 301 of the proteins identified in each region are provided in Supplementary Tables 1–3.

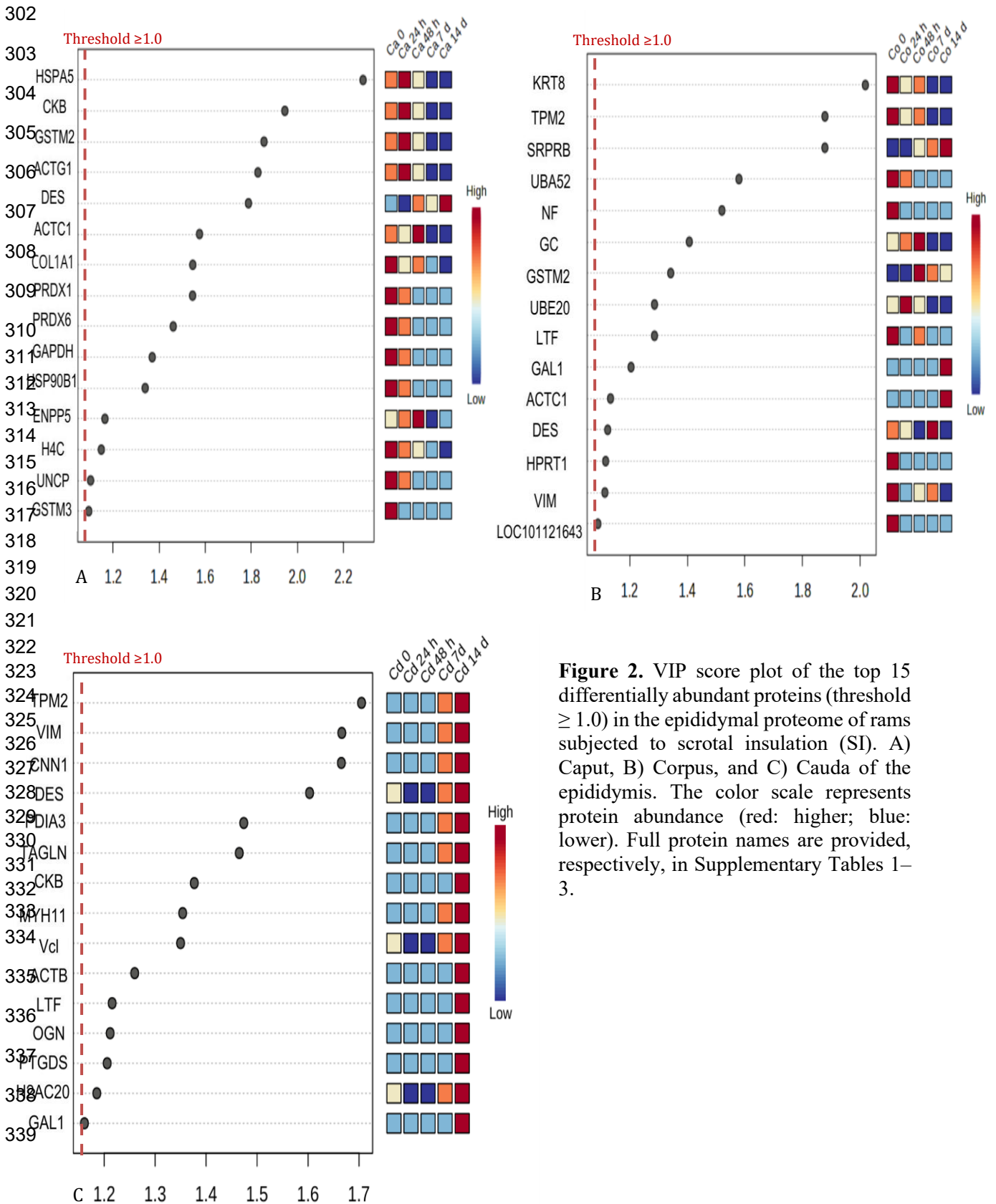


Figure 2. VIP score plot of the top 15 differentially abundant proteins (threshold ≥ 1.0) in the epididymal proteome of rams subjected to scrotal insulation (SI). A) Caput, B) Corpus, and C) Cauda of the epididymis. The color scale represents protein abundance (red: higher; blue: lower). Full protein names are provided, respectively, in Supplementary Tables 1–3.

340 Gene ontology (GO) analysis of the caput proteome revealed that, in the Biological
341 Process (BP) category, the most represented proteins were associated with responses to
342 chemical and organic substances. In the Cellular Component (CC) category, most proteins
343 were related to intracellular non-membranous components and organelles. For Molecular
344 Function (MF), the majority of proteins were involved in identical protein binding and
345 enzyme binding (Fig. 3).

346 In the corpus, BP enrichment was observed for pathways related to supramolecular
347 fiber organization, striated muscle cell development, myofibril assembly, and collagen fiber
348 organization. The CC category was dominated by proteins associated with complexes,
349 polymers, and supramolecular fibers, whereas in the MF category, structural molecular
350 activity and cytoskeleton binding were predominant (Fig. 4).

351 Finally, in the cauda, the most enriched BP terms were related to cellular organization
352 and development. The CC category was mainly represented by proteins associated with non-
353 membranous organelles and the cytoskeleton, while in the MF category, most proteins were
354 involved in ubiquitin binding (Fig. 5).

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414

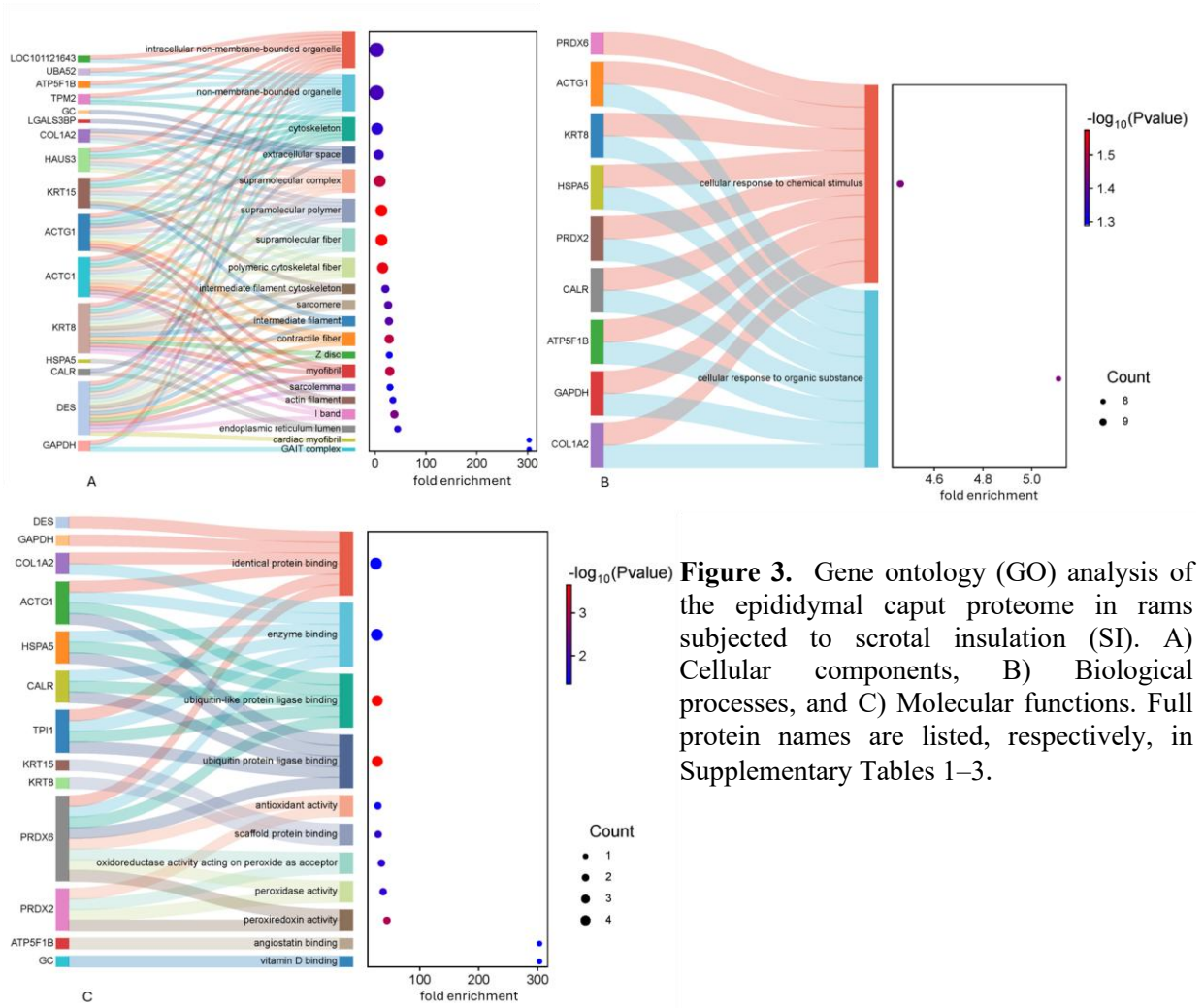


Figure 3. Gene ontology (GO) analysis of the epididymal caput proteome in rams subjected to scrotal insulation (SI). A) Cellular components, B) Biological processes, and C) Molecular functions. Full protein names are listed, respectively, in Supplementary Tables 1–3.

415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462

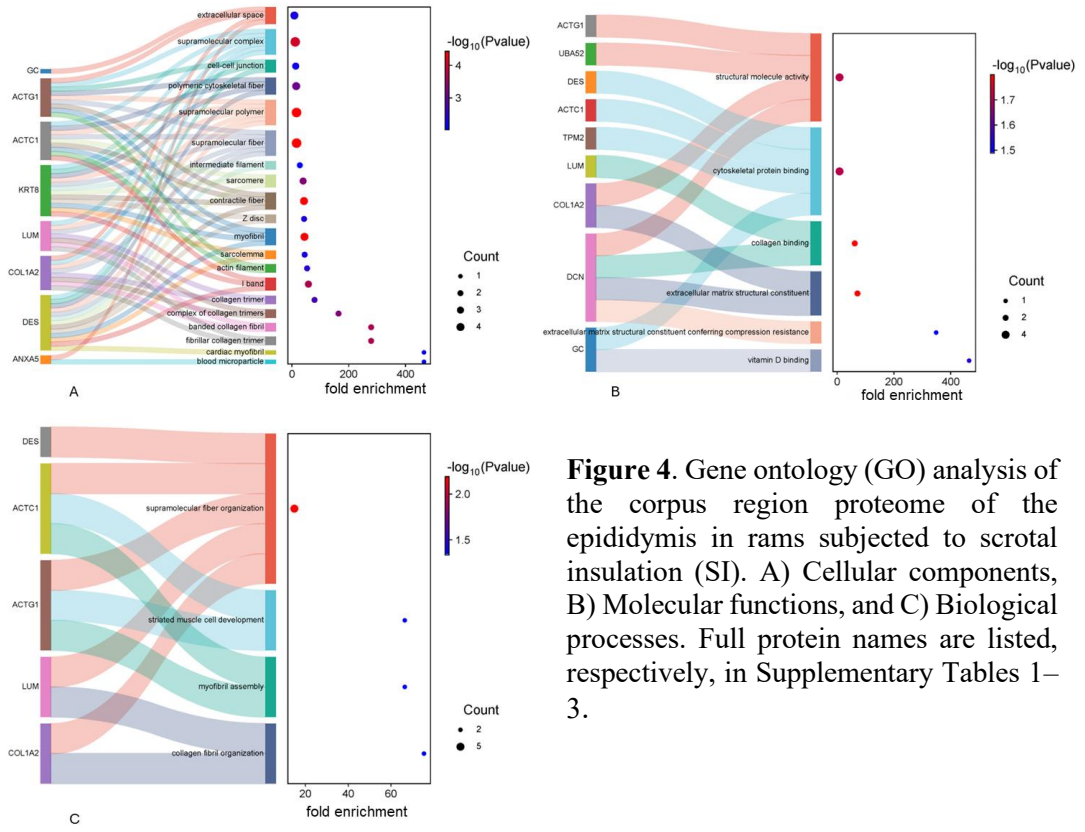


Figure 4. Gene ontology (GO) analysis of the corpus region proteome of the epididymis in rams subjected to scrotal insulation (SI). A) Cellular components, B) Molecular functions, and C) Biological processes. Full protein names are listed, respectively, in Supplementary Tables 1–3.

463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501

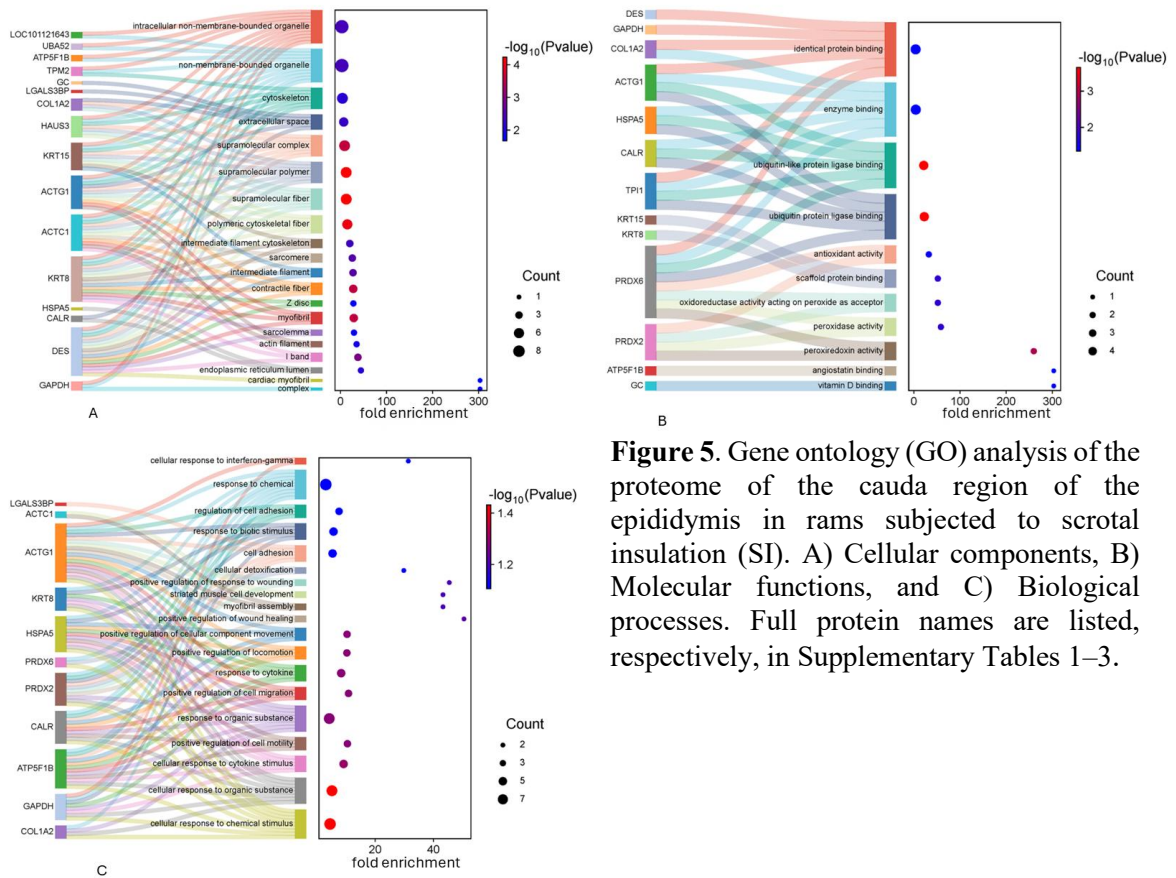


Figure 5. Gene ontology (GO) analysis of the proteome of the cauda region of the epididymis in rams subjected to scrotal insulation (SI). A) Cellular components, B) Molecular functions, and C) Biological processes. Full protein names are listed, respectively, in Supplementary Tables 1–3.

The PPI network of the DAPs. The Caput network presented 36 proteins, with 50 iterations (Fig. 6A), having GAPDH as the central protein. In the Corpus, the network displayed 21 proteins with 12 interactions (Fig. 6B), with TPM2 and LUM as central proteins. The Cauda, in a network containing 27 proteins and 51 interactions (Fig. 6C), had TPM2, VCL, TAGLN, CNN1, MYH11, ACTC1, ACTN1, and ACTA2 as central proteins.

502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547

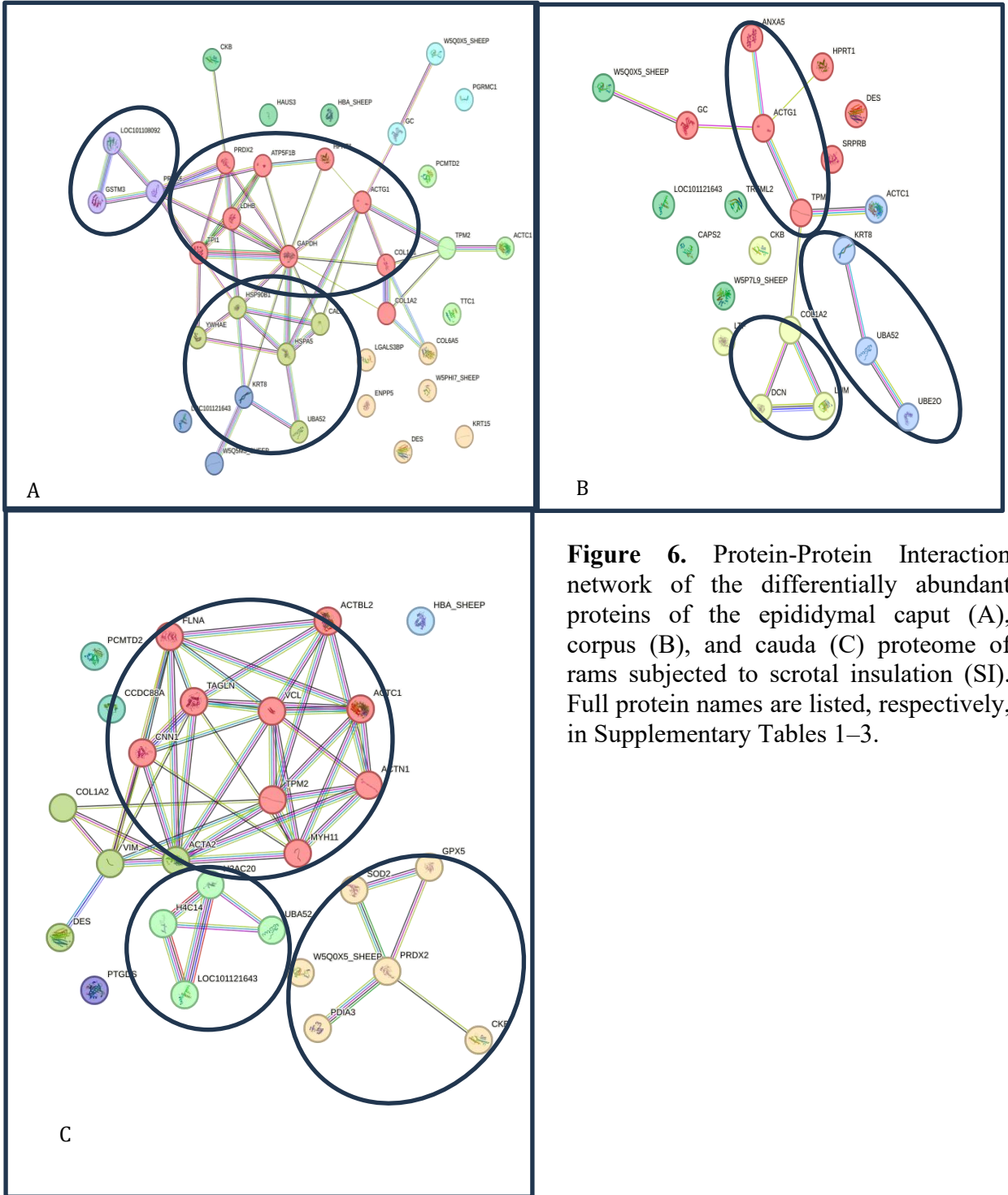


Figure 6. Protein-Protein Interaction network of the differentially abundant proteins of the epididymal caput (A), corpus (B), and cauda (C) proteome of rams subjected to scrotal insulation (SI). Full protein names are listed, respectively, in Supplementary Tables 1–3.

548 4 Discussion

549

550 This study was the first to investigate the individual proteome of each epididymal
551 segment in rams under scrotal HS. The findings described above provide compelling
552 evidence of the severity of the impact of HS on the male gonads.

553 The caput was the region with the highest number of DAPs, being considered the most
554 active part of the organ in terms of secretion and/or protein abundance [11], followed by the
555 Cauda and Corpus, respectively.

556 In the caput region of the epididymis, enrichment was mainly associated with
557 intracellular adaptive responses to chemical substances and organic compounds,
558 representing the activation of compensatory mechanisms aimed at restoring cellular
559 homeostasis and minimizing heat-induced damage. These processes involve increased
560 expression of proteins related to oxidative stress response, regulation of energy metabolic
561 pathways, and modulation of binding and transport proteins, which act together to preserve
562 the structural and functional integrity of epididymal cells. Such responses are essential for
563 maintaining sperm viability and functionality, reinforcing that, during the initial phases of
564 heat exposure, the epididymis adopts a predominantly cytoprotective strategy focused on
565 preserving cellular and metabolic functions before the activation of broader tissue repair
566 processes observed in chronic conditions [12].

567 In the corpus, the biological processes were associated with the organization of
568 supramolecular fibers, including components of the cytoskeleton and extracellular matrix.
569 These structures provide mechanical support and are fundamental for cell–cell adhesion,
570 intercellular communication, and tissue stability, especially under stressful conditions.
571 Proteins related to the formation of actin filaments, microtubules, and collagen fibers
572 indicate involvement in maintaining epithelial morphology. The enrichment of these
573 structural pathways reflects an intermediate adaptive response, preparing the epididymal
574 tissue for subsequent processes of repair and cellular remodeling observed at later stages (7
575 and 14 days) [13].

576 In the cauda, the biological processes revealed predominant involvement in pathways
577 related to the organization of intermediate actin filaments, extracellular matrix assembly,
578 cell differentiation and development, as well as cellular regeneration and protection
579 processes. These findings indicate that, in this region, epididymis activates complex
580 structural and reparative mechanisms aimed at restoring tissue integrity. The strong

581 interaction among actin-associated proteins, also evidenced in the protein–protein
582 interaction network, reinforces the hypothesis of a coordinated tissue effort to
583 counterbalance the deleterious effects of heat stress, indicating that the cauda plays a crucial
584 role in cytoskeletal reorganization and preservation of epithelial architecture. Thus, the
585 response observed in the cauda represents a late adaptive phase, characterized by
586 regenerative and protective events that ensure the continuity of epididymal function under
587 heat stress conditions [14].

588 Each region of the epididymis exhibited a distinct profile of Cellular Components
589 (CC), reflecting structural and functional adaptations to heat stress.

590 In the caput, there was significant enrichment in supramolecular complexes,
591 supramolecular polymers, and supramolecular fibers structural components essential for
592 cellular organization and stability. These elements play a crucial role in reorganizing the
593 cellular framework and adapting to adverse physiological conditions, such as pH and
594 temperature variations. The increased presence of these complexes indicates an acute
595 adaptive response aimed at maintaining the integrity of organelles and the cytoskeleton,
596 allowing epididymal cells to preserve their morphology and functionality even under
597 stressful conditions [15]. In the corpus, non-membranous organelles predominated, followed
598 by proteins located in extracellular regions, suggesting an important role in supporting the
599 cytoskeleton and maintaining the components of the extracellular matrix [16]. In the cauda,
600 the most enriched components included intracellular non-membranous organelles, non-
601 membranous organelles, the cytoskeleton, and the actin cytoskeleton. Non-membranous
602 organelles such as ribosomes, nucleoli, stress granules, glycogen, chaperone complexes, and
603 ribosomal proteins are associated with dynamic and regulatory intracellular processes [16].
604 These structures play fundamental roles in gene expression, maintenance of cellular
605 architecture, protein synthesis, and stress response, functioning without the need for lipid
606 membranes. This specialized organization enables rapid and efficient responses to stressful
607 challenges [14,17].

608 The Molecular Functions (MF) category revealed region-specific functional
609 strategies to cope with heat stress.

610 In the caput, the most enriched functions were identical protein binding, enzyme
611 binding, and ubiquitin ligase binding. These activities are crucial for regulating the cell cycle
612 and stress response: identical protein binding contributes to protein stabilization and

613 activation of cellular processes; enzyme binding modulates biochemical pathways that
614 support adaptation; and ubiquitin ligase binding directs damaged proteins for proteasomal
615 degradation, preventing harmful accumulation and promoting survival under stress
616 conditions [18]. In the corpus, structural protein activity and cytoskeletal protein binding
617 predominated, highlighting their role in mechanical support, cell adhesion, and cytoskeletal
618 integrity [19]. In the cauda, the most representative functions included cytoskeletal protein
619 binding, actin filament binding, and actin binding. These processes are essential for
620 structural adjustments that preserve integrity and functionality under chemical,
621 environmental, or mechanical stress, thereby sustaining homeostasis [19,20].

622 In the caput, the PPI network highlighted key proteins involved in glycolysis and
623 gluconeogenesis, with GAPDH regulating energy metabolism and ATP production [21,22].
624 Together with LDHB and ATP5F1B, GAPDH supports efficient energy production [23].
625 PRDX2 neutralizes reactive oxygen species (ROS), HPRT1 regulates purine metabolism,
626 and ACTG1, COL1A1, and COL1A2 contribute to the reorganization of the cytoskeleton
627 and extracellular matrix. TPI1 modulates inflammatory responses through signaling
628 pathways [19,24]. Genes related to glutathione metabolism indicate the activation of
629 antioxidant defenses. [22], while proteins of the Endoplasmic Reticulum-Associated
630 Degradation (ERAD) pathway, with HSPA5 as the central hub, maintain endoplasmic
631 reticulum homeostasis [17,25]HSP90B1, HSPA5, and UBA52 cooperate in protein quality
632 control, preventing the accumulation of misfolded proteins through the ubiquitin–
633 proteasome pathway [26,27].

634 In the corpus, proteins such as ANXA5, ACTG1, TPM2, HPRT1, and GC acted
635 together to maintain homeostasis, promote structural repair, regulate immune responses, and
636 mediate macrophage regeneration and activation [19,28–30]. In addition, interactions
637 associated with structural maintenance, cell cycle regulation, and protein degradation were
638 detected processes related to the protection of cells against irreversible damage through
639 reorganization and apoptosis control. UBA52 and UBE20 tag damaged proteins for
640 degradation via ubiquitination, while KRT8 stabilizes cellular structure under stress
641 [26,31,32]. DCN and LUM, associated with the extracellular matrix, regulate collagen
642 synthesis through TGF- β signaling, thereby modulating structure and inflammation and
643 preventing fibrosis [33,34].

644 Na cauda, a rede de PPI revelou fortes interações que sustentam o citoesqueleto e a
645 organização celular. VCL e FLNA conectam o citoesqueleto de actina a proteínas
646 transmembranares, enquanto ACTC1, ACTBL2, ACTA2 e ACTN1 estabilizam os
647 filamentos de actina. A cooperação entre ACTC1, MYH11 e TPM2 garante a estabilidade
648 mecânica do citoesqueleto sob estresse térmico [35–37]. Genes highlighted in light green are
649 involved in DNA damage recognition and repair: histones H4C14 and H2AC20 remodel
650 chromatin to protect DNA and activate heat shock proteins, while UBA52 mediates the
651 degradation of defective proteins. Finally, genes related to the oxidative stress response
652 maintain homeostasis through the sequential neutralization of ROS by PRDX2, SOD2, and
653 GPX5, with CKB ensuring an adequate energy supply during this process [8,38–41].

654 Protein families associated with actin filaments showed coordinated responses to
655 testicular heat stress, characterized by an initial phase of degradation followed by
656 mechanisms of structural recovery.

657 During the first 24 and 48 hours of scrotal insulation, a generalized reduction in
658 cytoskeletal proteins was observed, possibly resulting from caspase-mediated cleavage and
659 ubiquitin-dependent degradation during apoptosis. However, on days 7 and 14, a progressive
660 increase in abundance occurred, especially in the caput and cauda, indicating stress
661 adaptation processes, cytoskeletal repair, mitochondrial homeostasis restoration, and
662 recovery of cellular integrity [20,42–44]. This behavior also reflected an intensification of
663 actin filament assembly and stabilization, which is necessary to reestablish cellular and
664 structural organization [45–47]. After 14 days, a strong activation of structural proteins
665 aimed at stabilizing actin filaments and preserving epididymal cellular and muscular
666 integrity was observed, constituting an adaptive mechanism integrated into the thermal stress
667 response [14,20,43,44,48,49].

668 Protein families involved in heat stress response, antioxidant defense, protein quality
669 control, and tissue repair exhibited integrated temporal patterns, encompassing immediate
670 protection through adaptive recovery.

671 In the acute phases, an increase in molecular chaperones was observed, indicating a
672 rapid response to heat stress and repair of denatured proteins, while antioxidant enzymes
673 showed divergent regulation some being activated to neutralize reactive oxygen species
674 (ROS) and others inactivated by hyperthermia [8,24,50–53].

675 In parallel, antioxidant and anti-inflammatory proteins showed an initial reduction
676 within the first 24 hours, attributed to excessive consumption during stress, followed by an
677 increase after 48 hours, representing the reactivation of protective mechanisms and the
678 recovery of sperm function [9,54–56].

679 Proteins related to the immune response showed an increase during the acute phases,
680 indicating immune and anti-apoptotic responses, modulation of the inflammatory response,
681 and association with neutrophil activation and cellular repair [28,57–60]. In contrast,
682 structural and cell integrity proteins showed a transient decrease due to functional exhaustion
683 during the attempt to contain oxidative damage, followed by recovery after 48 hours,
684 indicating adaptation to adverse conditions [20,61].

685 Proteins associated with the ubiquitin–proteasome system and protease regulation
686 played an essential role in maintaining protein quality during heat stress, reflecting a
687 dynamic and coordinated response to the accumulation of damaged proteins. In the acute
688 phases, a reduction was observed, resulting from functional exhaustion caused by high
689 demand, while regulatory enzymes of ubiquitination showed a marked increase after 24
690 hours, indicating compensatory system activation and reinforcing its importance in
691 preserving cellular homeostasis under stress [18,26,62] In parallel, protease regulation was
692 compromised by the decrease in specific inhibitors, leading to functional inactivation due to
693 the activation of the suicide inhibition mechanism essential for restricting excessive protease
694 activity, controlling inflammatory processes, and preventing uncontrolled protein
695 degradation [63,64].

696 In the later phases (days 7 and 14), there was a marked increase in
697 immunomodulatory and regenerative proteins, promoting tissue restoration, inflammatory
698 balance, and antioxidant defense, indicating progressive recovery of epididymal homeostasis
699 [19,65–67].

700 Proteins related to energy metabolism showed marked temporal variations after heat
701 stress.

702 During the first 24 hours, an increase in the activity of proteins responsible for the
703 rapid supply of ATP was observed, especially in the caput region, ensuring energy
704 availability due to high energetic demand. However, the reduction after 48 hours suggests
705 functional exhaustion, resulting from the intense ATP utilization during this critical period.
706 In parallel, regulatory enzymes of energy metabolism showed a marked decrease due to

707 oxidation mediated by reactive oxygen species (ROS), which impaired their function and
708 contributed to the reduced sperm motility reported in animals subjected to the same stress
709 model [9].

710 During the acute period (24 and 48 hours), an increase in proteins associated with the
711 activation of thermoregulatory mechanisms was also observed, indicating cellular responses
712 aimed at maintaining energy and thermal balance. In the later phases (days 7 and 14),
713 especially in the cauda and corpus, there was a progressive increase in proteins involved in
714 cellular regeneration and new protein synthesis, evidencing the transition from survival
715 metabolism to repair metabolism [2,9,28,38,68–72].

716 An alternating pattern was observed in proteins associated with tissue structure,
717 inflammation, and gene regulation, indicating the dynamic adaptation of the epididymis to
718 heat stress induced damage. The initial increase in extracellular matrix components during
719 the acute period reflects responses related to structural integrity and tissue repair, suggesting
720 the occurrence of damage in epithelial and connective regions. This increase is often
721 associated with the action of matrix proteins involved in tissue healing and reorganization
722 after injury [73,74].

723 In the later phases, an increase in proteins involved in inflammatory modulation was
724 observed, particularly those related to prostaglandin synthesis—mediators that act in the
725 regulation of chronic inflammation and the restoration of local homeostasis. This late
726 response reinforces the presence of a persistent inflammatory process necessary for the
727 gradual repair of epididymal tissue after thermal insult [75–77].

728 Additionally, alterations were detected in nuclear proteins involved in gene
729 expression regulation and genetic material organization, which began to participate in
730 cellular protection, apoptosis, and protein damage control, playing a supporting role
731 alongside chaperones in coping with heat stress and maintaining cell viability [78].

732

733 **5 Conclusion**

734 This study provides the first segment-specific proteomic analysis of the ram
735 epididymis (caput, corpus, and cauda) under scrotal heat stress, revealing a coordinated, two-
736 phase adaptive response. Initially, proteins linked to cellular protection, chaperone activity,
737 structural stability, and oxidative stress defense were upregulated to buffer immediate
738 thermal damage. When these defenses were insufficient, the proteome shifted toward

739 pathways supporting tissue repair, sperm recovery, and functional restoration demonstrating
740 a dynamic transition from protection to repair. These findings underscore the complexity of
741 epididymal allostatic adaptation and offer novel molecular insights that may guide strategies
742 to safeguard male fertility in heat-challenged environments.

743

744 **Funding**

745 Funding We are grateful for the support obtained via CAPES (88887.571133/ 2020–00),
746 FAPESP (2020/15556–6), which supported the viability of the project.

747

References

- [1] Pinto Moreira E, De Alencar A, Moura A, Alencar De Araújo A. Efeitos da Insulação Escrotal sobre a Biometria Testicular e Parâmetros Seminais em Carneiros da Raça Santa Inês Criados no Estado do Ceará 1. 2001.
- [2] Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Unanian MM, Kastelic JP. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. *Anim Reprod Sci* 2003;79:1–15. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00082-4).
- [3] Martínez-Fresneda L, Sylvester M, Shakeri F, Bunes A, Del Pozo JC, García-Vázquez FA, et al. Differential proteome between ejaculate and epididymal sperm represents a key factor for sperm freezability in wild small ruminants. *Cryobiology* 2021;99:64–77. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.012>.
- [4] König HE, Liebich H-G. Anatomia dos Animais Domésticos. 4a edição. Porto Alegre - RS: Artimed; 2011.
- [5] Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Anim Reprod Sci* 1997;45:255–61.
- [6] Turner TT. Resorption versus secretion in the rat epididymis. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd* 1984;72:509–14. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720509>.
- [7] Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009;15:213–27. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>.
- [8] Xu G, Ye X, Vashisth MK, Zhao W. Correlation between PRDX2 and spermatogenesis under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2023;656:139–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.03.050>.
- [9] Teixeira MB, Ferreira JCP, Codognoto VM, Rossi ES, Pupulim AGR, De Carvalho JC, et al. Heat stress induced by testicular insulation for 24 or 48 h rapidly impairs epididymal sperm quality and reduces spermatogenesis in rams. *Small Ruminant Research* 2025;243:107443. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2025.107443>.
- [10] Jimoh OA, Ewuola EO, Acheneje P. Sexual urge, semen quality and seminal oxidative markers of rabbit bucks of different reproductive stages in response to peak of heat stress in Southwest of Nigeria. *Nigerian Journal of Animal Production* 2021;48:27–37. <https://doi.org/10.51791/njap.v48i2.2937>.
- [11] Dacheux JL, Dacheux F, Druart X. Epididymal protein markers and fertility. *Anim Reprod Sci* 2016;169:76–87. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.034>.
- [12] Björkgren I, Sipilä P. The impact of epididymal proteins on sperm function. *Reproduction* 2019;158:R155–67. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0589>.
- [13] Sullivan R, Belleannée C. Cell Biology of the Epididymis. *Encyclopedia of Reproduction*, Elsevier; 2018, p. 286–91.
- [14] Collier MP, Benesch JLP. Small heat-shock proteins and their role in mechanical stress. *Cell Stress Chaperones* 2020;25:601–13. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01095-z>/Published.
- [15] Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)* 2020;9:21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>.
- [16] Stroberg W, Schnell S. On the origin of non-membrane-bound organelles, and their physiological function. *J Theor Biol* 2017;434:42–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.04.006>.
- [17] Wang J, Lee J, Liem D, Ping P. HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. *Gene* 2017;618:14–23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.005>.
- [18] Maxwell BA, Gwon Y, Mishra A, Peng J, Nakamura H, Zhang K, et al. Ubiquitination is essential for recovery of cellular activities following heat shock. *Science* 2021;372:eabc3593. <https://doi.org/10.1126/science.abc3593>.

- [19] Choi Y, Park H, Kim J, Lee H, Kim M. Heat Stress Induces Alterations in Gene Expression of Actin Cytoskeleton and Filament of Cellular Components Causing Gut Disruption in Growing–Finishing Pigs. *Animals* 2024;14:2476. <https://doi.org/10.3390/ani14172476>.
- [20] Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol* 2010;20:79–91. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.11.004>.
- [21] Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:674–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x>.
- [22] Yang Q, Liu J, Wang Y, Zhao W, Wang W, Cui J, et al. A proteomic atlas of ligand–receptor interactions at the ovine maternal–fetal interface reveals the role of histone lactylation in uterine remodeling. *Journal of Biological Chemistry* 2022;298. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101456>.
- [23] Naletova I, Schmalhausen E, Tomasello B, Pozdyshev D, Attanasio F, Muronetz V. The role of sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the development of pathologies—from asthenozoospermia to carcinogenesis. *Front Mol Biosci* 2023;10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1256963>.
- [24] IMMENSCHUH S, BAUMGART-VOGT E. Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:768–77.
- [25] Liu Y, Testa JS, Philip R, Block TM, Mehta AS. A ubiquitin independent degradation pathway utilized by a Hepatitis B virus envelope protein to limit antigen presentation. *PLoS One* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024477>.
- [26] Martín-Villanueva S, Gutiérrez G, Kressler D, de la Cruz J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins and domains in ribosome production and function: Chance or necessity? *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22094359>.
- [27] Ren C, Sun Z, Chen Y, Chen J, Wang S, Liu Q, et al. Identification of Biomarkers Affecting Cryopreservation Recovery Ratio in Ram Spermatozoa Using Tandem Mass Tags (TMT)-Based Quantitative Proteomics Approach. *Animals (Basel)* 2023;13:2368. <https://doi.org/10.3390/ani13142368>.
- [28] Delrue C, Speeckaert MM. Vitamin D and Vitamin D-Binding Protein in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2023;24. <https://doi.org/10.3390/ijms24054642>.
- [29] Bouter A, Carmeille R, Gounou C, Bouvet F, Degrelle SA, Evain-Brion D, et al. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta* 2015;36:S43–9. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.01.193>.
- [30] Sundby LJ, Southern WM, Hawbaker KM, Trujillo JM, Perrin BJ, Ervasti JM. Nucleotide- and Protein-Dependent Functions of Actg1. *Mol Biol Cell* 2022;33:ar77. <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-02-0054>.
- [31] Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, et al. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol* 2008;215:684–96. <https://doi.org/10.1002/jcp.21349>.
- [32] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2004;1695:55–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.019>.
- [33] Karamanou K, Perrot G, Maquart F-X, Brézillon S. Lumican as a multivalent effector in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;129:344–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.011>.
- [34] Ding Z, Xiong L, Wang X, Guo S, Cao M, Kang Y, et al. Comparative Analysis of Epididymis Cauda of Yak before and after Sexual Maturity. *Animals (Basel)* 2023;13:1355. <https://doi.org/10.3390/ani13081355>.
- [35] Percipalle P. Genetic connections of the actin cytoskeleton and beyond. *BioEssays* 2007;29:407–11. <https://doi.org/10.1002/bies.20570>.
- [36] Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2008;1778:660–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>.
- [37] Li X, Yao J, Hu J, Deng C, Xie Y, Wang Z. iTRAQ-based proteomics of testicular interstitial fluid during aging in mice. *Theriogenology* 2021;175:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.034>.

- [38] He L, Lin J, Lu S, Li H, Chen J, Wu X, et al. CKB Promotes Mitochondrial ATP Production by Suppressing Permeability Transition Pore. *Advanced Science* 2024;11:2403093. <https://doi.org/10.1002/advs.202403093>.
- [39] Zhuang A, Yang C, Liu Y, Tan Y, Bond ST, Walker S, et al. SOD2 in skeletal muscle: New insights from an inducible deletion model. *Redox Biol* 2021;47:102135. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102135>.
- [40] Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2013;1830:3289–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>.
- [41] Huang J, Li S, Yang Y, Li C, Zuo Z, Zheng R, et al. GPX5-Enriched Exosomes Improve Sperm Quality and Fertilization Ability. *Int J Mol Sci* 2024;25:10569. <https://doi.org/10.3390/ijms251910569>.
- [42] Agnetti G, Herrmann H, Cohen S. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis. *FEBS J* 2022;289:2755–70. <https://doi.org/10.1111/febs.15864>.
- [43] Hao Y, Cui Y, Gu X. Genome-wide DNA methylation profiles changes associated with constant heat stress in pigs as measured by bisulfite sequencing. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep27507>.
- [44] Howes EA, Hurst SM, Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: Potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *J Androl* 2001;22:62–72. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.2001.TB02154.X>.
- [45] Skibiél AL, Koh J, Zhu N, Zhu F, Yoo MJ, Laporta J. Carry-over effects of dry period heat stress on the mammary gland proteome and phosphoproteome in the subsequent lactation of dairy cows. *Sci Rep* 2022;12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10461-z>.
- [46] Gunning PW, Hardeman EC, Lappalainen P, Mulvihill DP. Tropomyosin – master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J Cell Sci* 2015;jcs.172502. <https://doi.org/10.1242/jcs.172502>.
- [47] Hsieh T-B, Jin J-P. Evolution and function of calponin and transgelin. *Front Cell Dev Biol* 2023;11:1206147. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1206147>.
- [48] Ali Khan H, Mutus B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front Chem* 2014;2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00070>.
- [49] Mahé C, Lavigne R, Com E, Pineau C, Zlotkowska AM, Tsikis G, et al. The sperm-interacting proteome in the bovine isthmus and ampulla during the periovulatory period. *J Anim Sci Biotechnol* 2023;14. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00811-2>.
- [50] Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2018;19:2560. <https://doi.org/10.3390/ijms19092560>.
- [51] Kaushik R, Goel A, Rout PK. Differential expression and regulation of HSP70 gene during growth phase in ruminants in response to heat stress. *Sci Rep* 2022;12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22728-6>.
- [52] Dangi SS, Gupta M, Nagar V, Yadav VP, Dangi SK, Shankar O, et al. Impact of short-term heat stress on physiological responses and expression profile of HSPs in Barbari goats. *Int J Biometeorol* 2014;58:2085–93. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0809-5>.
- [53] Aboul Naga AM, Abdel Khalek TM, Osman M, Elbeltagy AR, Abdel-Aal ES, Abou-Ammo FF, et al. Physiological and genetic adaptation of desert sheep and goats to heat stress in the arid areas of Egypt. *Small Ruminant Research* 2021;203. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106499>.
- [54] Kobayashi J, Sasaki A, Watanabe A, Komine K, Kuroishi T, Takada N, et al. Effects of exogenous lactoferrin on characteristics and functions of bovine epididymal, ejaculated and frozen-thawed sperm. *Animal Science Journal* 2021;92. <https://doi.org/10.1111/asj.13538>.
- [55] Pearl CA, Roser JF. Lactoferrin expression and secretion in the stallion epididymis. *Reprod Biol* 2014;14:148–54. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.10.005>.
- [56] Al Zharani MM, Almuqri EA, Ahmed MM, Aljarba NH, Rudayni HA, Yaseen KN, et al. Use of Lactoferrin Supplement as an Efficient Antioxidant to Ameliorate the Effects of Mercury-induced Oxidative Stress in Male Wistar Rats. *Biomedical and Biotechnology Research Journal* 2024;8:45–52. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_262_23.
- [57] Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: More than vitamin D binding. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;29:773–86. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.06.006>.

- [58] Metcalf JP, Thompson AB, Gossman GL, Nelson KJ, Koyama S, Rennard SI, et al. GcGlobulin functions as a cochemotaxin in the lower respiratory tract: A potential mechanism for lung neutrophil recruitment in cigarette smokers. *American Review of Respiratory Disease* 1991;143:844–9. https://doi.org/10.1164/AJRCCM/143.4_PT_1.844,.
- [59] Kew RR, Fisher JA, Webster RO. Co-chemotactic effect of Gc-globulin (vitamin D binding protein) for C5a. Transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils. *J Immunol* 1995;155:5369–74.
- [60] DiMartino SJ, Shah AB, Trujillo G, Kew RR. Elastase Controls the Binding of the Vitamin D-Binding Protein (Gc-Globulin) to Neutrophils: A Potential Role in the Regulation of C5a Co-Chemotactic Activity. *The Journal of Immunology* 2001;166:2688–94. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.4.2688>.
- [61] Flitney EW, Kuczmarski ER, Adam SA, Goldman RD. Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *The FASEB Journal* 2009;23:2110–9. <https://doi.org/10.1096/fj.08-124453>.
- [62] Fraser J, Luu HA, Neculcea J, Thomas DY, Storms RK. Ubiquitin gene expression: response to environmental changes. *Curr Genet* 1991;20:17–23. <https://doi.org/10.1007/BF00312760>.
- [63] Van Gent D, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N. Serpins: Structure, function and molecular evolution. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2003;35:1536–47. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00134-1).
- [64] Bouton M, Geiger M, Sheffield WP, Irving JA, Lomas DA, Song S, et al. The under-appreciated world of the serpin family of serine proteinase inhibitors. *EMBO Mol Med* 2023;15:e17144. <https://doi.org/10.15252/emmm.202217144>.
- [65] Pérez C V, Gómez LG, Gualdoni GS, Lustig L, Rabinovich GA, Guazzone VA. Dual roles of endogenous and exogenous galectin-1 in the control of testicular immunopathology. *Sci Rep* 2015;5:12259. <https://doi.org/10.1038/srep12259>.
- [66] Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *The Journal of Immunology* 2017;199:3721–30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701172>.
- [67] Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:318–27. <https://doi.org/10.1038/nrm1618>.
- [68] Moreira EP, Moura A de AA, Araújo AA de. Efeitos da Insulação Escrotal sobre a Biometria Testicular e Parâmetros Seminais em Carneiros da Raça Santa Inês Criados no Estado do Ceará. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001;30:1704–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000700007>.
- [69] Sharma RK, Chafik A, Bertolin G. Aurora kinase A/AURKA functionally interacts with the mitochondrial ATP synthase to regulate energy metabolism and cell death. *Cell Death Discov* 2023;9. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01501-2>.
- [70] Kumar KN, Veerappa VG, Kumaresan A, Lavanya M, King JES, Sulochana M, et al. Localization and expression analysis of sperm-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in bull spermatozoa with contrasting sperm motility. *Andrology* 2024. <https://doi.org/10.1111/ANDR.13810>,.
- [71] Borza R, Salgado-Polo F, Moolenaar WH, Perrakis A. Structure and function of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP) family: Tidying up diversity. *Journal of Biological Chemistry* 2022;298:101526. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.101526>.
- [72] Oliveira LF, Veroneze R, Sousa KRS, Mulim HA, Araujo AC, Huang Y, et al. Genomic regions, candidate genes, and pleiotropic variants associated with physiological and anatomical indicators of heat stress response in lactating sows. *BMC Genomics* 2024;25. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10365-4>.
- [73] Thul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Science* 2018;27:233–44. <https://doi.org/10.1002/pro.3307>.
- [74] Gibbon A, Raleigh SM, Ribbans WJ, Posthumus M, Collins M, September A V. Functional COL1A1 variants are associated with the risk of acute musculoskeletal soft tissue injuries. *Journal of Orthopaedic Research* 2020;38:2290–8. <https://doi.org/10.1002/jor.24621>.

- [75] Belleannée C, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gatti JL, Dacheux JL, Dacheux F. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J Proteomics* 2011;74:59–78. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.013>.
- [76] Delkhosh A, Shoorei H, Niazi V, Delashoub M, Gharamaleki MN, Ahani-Nahayati M, et al. Coenzyme Q10 ameliorates inflammation, oxidative stress, and testicular histopathology in rats exposed to heat stress. *Hum Exp Toxicol* 2021;40:3–15. <https://doi.org/10.1177/0960327120940366>.
- [77] Yu TY, Yong YH, Li JY, Fang B, Hu CY, Wu LY, et al. Proteomic study of hypothalamus in pigs exposed to heat stress. *BMC Vet Res* 2020;16. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02505-1>.
- [78] Osakabe A, Molaro A. Histone renegades: Unusual H2A histone variants in plants and animals. *Semin Cell Dev Biol* 2023;135:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.05.001>.

1. Supplementary Material

Protein name	Gene symbol	FDR
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	0.00
Creatine kinase B-type	CKB	0.00
Desmin	DES	0.00
glutathione transferase	LOC101108092	0.00
VWFA domain-containing protein	COL6A5	0.00
Epsilon III beta-globin	LOC101105685	0.00
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain-containing protein 2	PCMTD2	0.00
Glutathione S-transferase	GSTM3	0.00
Vitamin D-binding protein	GC	0.00
Serpin domain-containing protein	-	0.00
Ig-like domain-containing protein	IGL	0.00
Beta-C globin	LOC100134870	0.00
Peroxiredoxin-2	PRDX2	0.00
Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	0.00
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	ENPP5	0.00
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	0.00
Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29	0.00
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1	0.00
Peroxiredoxin-6	PRDX6	0.00
Heat shock protein 90 kDa beta member 1	HSP90B1	0.00
Serpin domain-containing protein	LOC101116892	0.00
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	0.00

Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	0.00
Keratin, type I cytoskeletal 15	KRT15	0.00
Tetratricopeptide repeat protein 1	TTC1	0.00
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	0.00
N-acyl-aliphatic-L-amino acid amidohydrolase	ACY1	0.00
Membrane-associated progesterone receptor component 1	PGRMC1	0.00
HAUS augmin-like complex subunit 3 N-terminal domain-containing protein	HAUS3	0.00
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	0.00
Tubulin alpha chain	LOC101120326	0.00
Alpha globin chain	LOC101108797	0.00
Acrosin-binding protein	-	0.00
Serpin domain-containing protein	LOC101115576	0.00
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	0.00
Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	0.00
Calreticulin	CALR	0.00
L-lactate dehydrogenase	LDHB	0.00
Ig-like domain-containing protein	IGL	0.00
Histone H2B	LOC101121643	0.01
Tubulin alpha-1C chain	LOC108928243	0.01
Keratin 18	KRT18	0.01
Histone H4	LOC114112654	0.01
Collagen type I alpha 2	COL1A2	0.01
Signal recognition particle receptor subunit beta	SRPRB	0.01
Triosephosphate isomerase	TPI1	0.01
Tropomyosin beta chain	TPM2	0.02

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	HPRT1	0.02
ATP synthase subunit beta	ATP5F1B	0.02
Ubiquitin-ribosomal protein eL40 fusion protein	UBA52	0.03

Table 1 – Differentially abundant proteins in the caput of the epididymis of rams subjected to testicular insulation, compared to all time points of the study.

Protein name	Gene symbol	FDR
Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	0.00
Galectin	GAL1	0.00
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	0.00
Serpin domain-containing protein	-	0.00
Ig-like domain-containing protein	IGL	0.00
Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	0.00
Creatine kinase B-type	CKB	0.00
Tropomyosin beta chain	TPM2	0.00
Ubiquitin-ribosomal protein eL40 fusion protein	UBA52	0.00
Desmin	DES	0.00
glutathione transferase	GSTM2	0.00
Kinesin light chain 1	KLC1	0.00
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	0.00
Serpin domain-containing protein	LOC101115576	0.00
RNase H type-1 domain-containing protein	-	0.00
Immunoglobulin V-set domain-containing protein	TREML2	0.00
EF-hand domain-containing protein	CAPS2	0.00
Annexin	ANXA5	0.00
Lipocalin/cytosolic fatty-acid binding domain-containing protein	LOC101116018	0.00
Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	0.00
Collagen type I alpha 2	COL1A2	0.00
Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7	0.00
Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29	0.00
Histone H2B	LOC101121643	0.00

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	HPRT1	0.00
Vimentin	VIM	0.00
Vitamin D-binding protein	GC	0.01
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1	0.01
Lactotransferrin	LTF	0.01
UBC core domain-containing protein	UBE2O	0.01
Beta-C globin	LOC100134870	0.01
Decorin	DCN	0.01
Signal recognition particle receptor subunit beta	SRPRB	0.02
Lumican	LUM	0.03

Table 2. Differentially abundant proteins in the corpus of the epididymis of rams subjected to testicular insulation, compared to all time points of the study.

Protein name	Gene symbol	FDR
Galectin	GAL1	0.00
Mimecan	LOC114109700	0.00
Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS	0.00
Creatine kinase B-type	CKB	0.00
Actin, cytoplasmic 1	ACTBL2	0.00
Alpha globin chain	LOC101108797	0.00
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain-containing protein 2	PCMTD2	0.00
Desmin	DES	0.00
Peroxiredoxin-2	PRDX2	0.00
glutathione transferase	GSTM2	0.00
Alpha-actinin-1	ACTN1	0.00

Calponin	CNN1	0.00
Lactotransferrin	-	0.00
Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	0.00
Calponin-homology (CH) domain-containing protein	FLNA	0.00
Vinculin	VCL	0.00
Vimentin	VIM	0.00
Histone H2B	LOC101121643	0.00
Tropomyosin beta chain	TPM2	0.00
Histone H2A	LOC101122645	0.00
Collagen alpha-1(I) chain	-	0.00
Beta-C globin	LOC100134870	0.00
Transgelin	TAGLN	0.00
Calponin-homology (CH) domain-containing protein	CCDC88A	0.00
Alpha-2-HS-glycoprotein	-	0.00
Ubiquitin-ribosomal protein eL40 fusion protein	UBA52	0.00
Serpin domain-containing protein	LOC101115576	0.00
Superoxide dismutase	SOD2	0.00
Protein disulfide-isomerase	PDIA3	0.00
Myotubularin phosphatase domain-containing protein	-	0.00
THAP-type domain-containing protein	-	0.00
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1	0.00
Peroxidase	-	0.00
Glutathione peroxidase	GPX5	0.00
Fibrillar collagen NC1 domain-containing protein	COL1A2	0.01
Keratin, type I cytoskeletal 10	-	0.02

Signal recognition particle receptor subunit beta	-	0.02
Histone H4	LOC114112654	0.02
Myosin-11	MYH11	0.02

Table 3. Differentially abundant proteins in the cauda of the epididymis of rams subjected to testicular insulation, compared to all time points of the study.

ASS	PROTEIN NAME	GENE SYMBOL
A0A836CRP7	AAA+ ATPase domain-containing protein	DNAH3*
A0A836D368	Acetylcholinesterase	CEL*
A0A6P3EDP8	Acetyl-CoA carboxylase kinase	PRKAA1
A0A836D5L5	Acrosin-binding protein	ACRBP
A0A6P3E6H9	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1
A0A835ZL29	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2*
P60713	Actin, cytoplasmic 1	ACTB
A0A3R5SS76	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1
A0A6P7EAM5	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	ascc3
A0A836D1V5	Acyl-coenzyme A thioesterase 1-like	ACOT4*
A0A6P7EPS1	Adenosine receptor A1	ADORA1
A0A6P9FQJ4	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1
A0A6P3CX08	ADP/ATP translocase	SLC25A6
A0A836AFV7	Afadin- and alpha-actinin-binding protein	SSX2IP*
P14639	Albumin	ALB
W5PWE9	Albumin	ALB
A0A836AFF8	Albumin	ALB
A0A836AM83	aldehyde dehydrogenase (NAD(+))	ALDH1A1
A0A835ZVN0	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	ALDH16A1*
A0A836D626	Alkaline phosphatase	LOC111154696
A0A6P7DGJ5	Alpha globin chain	HBAI
I1WXR3	Alpha-1-antitrypsin transcript variant 1	SERPINA1
W5PD91	Alpha-1-syntrophin	SNTA1
A0A836APZ4	Alpha-2-HS-glycoprotein	*
W5QH56	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG
A0A6P7E9J3	Alpha-actinin-1	Actn1
A0A836APD7	alpha-amylase	*
A0A836CVU5	Alpha-crystallin B chain	CRYAB
A0A6P7E7V3	Alpha-fetoprotein	AFP
D2D3I8	Alpha-S1-casein	CSN1S1
A0A835ZYJ7	Angiotensin-converting enzyme	ACE
A0A835ZZ92	Ankyrin repeat domain-containing protein 26-like	*
A0A836D1K4	Annexin	ANXA2

A0A6P3TEE5	Annexin	ANXA5
A0A835ZK79	Annexin	*
A0A836A4E4	Anoctamin	ANO3
A0A836D3P9	Anterior gradient protein 2 homolog	AGR2
A0A836AMS5	Antizyme inhibitor 2-like	LOC103666747*
A0A835ZSR3	Apolipoprotein A-I	APOA1*
A0A836A2A5	ARID domain-containing protein	ARID1A*
A0A836CST1	Armadillo repeat-containing domain-containing protein	ARMCX4
W5NY19	ASCH domain-containing protein	CXHXorf40B*
A0A836D8L9	ATP synthase subunit alpha	ATP5F1A
A0A8N7XJ64	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1*
A0A836AL76	ATP synthase subunit beta	ATP5F1B
A0A6P7DBQ9	ATPase PAAT	C26H10orf88
A0A836AAZ0	ATP-binding cassette sub-family C member 9	ABCC9
A0A836D0M0	ATP-binding cassette sub-family D member 4	ABCD4
A0A6P3EA57	ATP-dependent RNA helicase	DDX10
Q1KYZ7	Beta-A globin chain	HBBA
A0A0F6YFJ0	Beta-C globin	HBBC
A0A835ZYQ8	Beta-catenin-like protein 1 N-terminal domain-containing protein	CTNBL1
A0A6P3TWQ3	Beta-enolase	ENO3*
A0A6P3EH81	Beta-hexosaminidase	Hexb*
Q1A2D1	Beta-K globin chain	HBBK
A0A6P3YQF9	Biglycan	BGN
A0A835ZVZ3	Biliverdin reductase A	*
A0A835ZWZ5	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	CFL2
A0A836CYK9	BTB domain-containing protein	BTBD18*
W5Q7I7	BTB domain-containing protein	RHOBTB3
A0A836D276	BTB/POZ domain-containing protein KCTD8-like	*
W5PI33	C1q domain-containing protein	COL10A1
A0A836A1K2	C2 domain-containing protein	CPNE3
W5P695	C2H2-type domain-containing protein	KLF8
A0A835ZLM0	C2H2-type domain-containing protein	Zfp532*
A0A836CQW1	C2H2-type domain-containing protein	ZNF516*
A0A836ABK7	C2H2-type domain-containing protein	IKZF2

A0A836AMP7	C2H2-type domain-containing protein	ZNF804A*
A0A835ZNA9	CABIT domain-containing protein	GAREM1
A0A836A0H4	Cadherin domain-containing protein	Cdh9
A0A836AHT1	Cadherin domain-containing protein	PCDHGC4*
A0A836A685	Cadherin domain-containing protein	PCDHB5
A0A6P3YHQ8	Calnexin	CANX
A0A836D2P7	Calponin	CNN1*
A0A6P7DLX7	Calponin-homology (CH) domain-containing protein	FLNA
A0A835ZI39	Calponin-homology (CH) domain-containing protein	Dmd_0*
W5NWL0	Calponin-homology (CH) domain-containing protein	CCDC88A
A0A835ZRA3	Calponin-homology (CH) domain-containing protein	PARVA*
A0A836ADW8	Calponin-homology (CH) domain-containing protein	SPTBN5
A0A6P3E5I0	Calreticulin	CALR
A0A6P7ED26	Carbonic anhydrase	CA2
A0A6P3TQK8	Carboxypeptidase Q	CPQ
A0A836AAG7	CASP8-associated protein 2	CASP8AP2
A0A836A340	Catenin delta 2	CTNND2*
A0A6P3EHD3	CBF1-interacting co-repressor CIR N-terminal domain-containing protein	CWC25*
A0A836CYQ3	Centromere protein F	CENPF
A0A836D000	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 6	CLN6
A0A6P9FQM8	CETN2	CETN2
W5PFF2	CG025 protein	C4H7orf25
A0A836CP14	Chloride channel protein	CLCN5*
A0A836A820	Chromo domain-containing protein	CBX2*
A0A6P3TM89	Clusterin	LOC101113728
A0A6P7EUL9	Coatomer subunit beta	COPB1
A0A835ZXM7	Cofilin-1	CFL1
W5P528	Coiled-coil domain-containing protein	*
W5PDC9	Coiled-coil domain-containing protein 110	CCDC110
A0A836ALZ7	Coiled-coil domain-containing protein 141	*
A0A835ZZ30	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1
A0A836D5E3	Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1
A0A836D2Z7	Collagen alpha-1(XIV) chain	COL14A1*
A0A836ANV2	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3

A0A836D8J7	Complement C5	C5
A0A836CZA7	Cortactin-binding protein-2 N-terminal domain-containing protein	FILIP1*
A0A6P3T5I6	CR032 protein	*
A0A836D3Z8	CRAL-TRIO domain-containing protein	BNIP2*
A0A836AQC9	C-reactive protein	LOC101115495*
A0A6P7D3X4	Creatine kinase B-type	CKB
A0A6P3E573	CTLH domain-containing protein	MKLN1*
A0A835ZZ02	CUB domain-containing protein	LRP12*
W5PE35	CUB domain-containing protein	LOC100295703*
W5P893	CXXC motif containing zinc binding protein	CZIB
A0A836D5X6	Cytoplasmic FMR1-interacting protein	CYFIP2*
W5NZQ2	Cytosol aminopeptidase	LAP3
A0A836AE92	Cytosol aminopeptidase	LAP3
A0A835ZNK0	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2
W5Q852	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	D2HGDH
A0A836CU81	DALR anticodon binding domain-containing protein	DALRD3
A0A6P7E2Q0	DDB1- and CUL4-associated factor 15 WD40 repeat-containing domain-containing protein	DCAF15*
W5PVY6	D-dopachrome decarboxylase	Ddt
A0A6P3TDF7	Decorin	DCN
A0A836CSK5	Deleted in lung and esophageal cancer protein 1	DLEC1
A0A6P7EPP3	Dendritic cell-specific transmembrane protein-like domain-containing protein	DCST2
A0A6P3TYP9	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	SAMHD1*
A0A6P3E6L1	Desmin	DES
A0A836CSA1	Disks large-associated protein 1	DLGAP1*
A0A6P7EKY8	DNA helicase	Chd3*
A0A836D5Z4	DNA mismatch repair proteins mutS family domain-containing protein	MSH3*
A0A836A0U4	DnaJ homolog subfamily A member 4	DNAJA4*
A0A836CWA8	DnaJ homolog subfamily C member 1	DNAJC1*
W5PGX0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	DDOST
A0A836CT28	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1
A0A6P7ERV1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	RPN2
A0A6P3EG33	Dynein axonemal assembly factor 4	DNAAF4
A0A835ZQN7	E3 ubiquitin-protein ligase CHFR	CHFR
A0A836AEI6	E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	herc1

A0A835ZYH4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	Ubr5
A0A836ACI2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	ENPP3*
A0A836CS72	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	ENPP5
A0A836CUX5	EF-hand domain-containing protein	
A0A835ZR90	EF-hand domain-containing protein	NUCB2
W5PZ73	EF-hand domain-containing protein	ENPP*
A0A6P3YMN3	EF-hand domain-containing protein	RCN2
A0A836D2Y8	EF-hand domain-containing protein	*
W5PZD8	EF-hand domain-containing protein	CAPS2
A0A836A483	EH domain-containing protein 2	EHD2
A0A6P3TG06	ELMO domain-containing protein	ELMO1
A0A6P7EG13	Elongation factor 1-alpha	EEF1A1
A0A836D1L9	Endogenous retrovirus group PABLB member 1 Env polyprotein-like	LOC104969408*
A0A835ZW61	Endoplasmic reticulum membrane sensor NFE2L1	NFE2L1*
A0A835ZXR2	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29
A0A835ZP09	Endoplasmin	*
A0A6P3TF14	Endoplasmin	HSP90B1*
A0A836AIN9	Epithelial cell adhesion molecule	EPCAM
A0A0F6VY37	Epsilon III beta-globin	HBE1*
A0A836D4U0	F-actin monooxygenase	MICAL3*
A0A836CTL7	FAM86 N-terminal domain-containing protein	*
A0A836AAA1	FERM and PDZ domain-containing protein 1	FRMPD1
A0A836CQY3	FERM domain-containing protein	EPB41L3*
A0A6P3ECH0	Ferritin	FTL
W5PYK1	Fibrillar collagen NC1 domain-containing protein	COL24A1
A0A835ZZ97	Fibrinogen alpha chain	FGA
A0A836CX51	Fibronectin type-II domain-containing protein	*
A0A836AD73	Fibrous sheath-interacting protein 2 C-terminal domain-containing protein	FSIP2*
W5P4D8	Forkhead box protein G1	FOXG1*
A0A836D4T0	Fork-head domain-containing protein	FOXM1*
A0A836ABE0	Galectin	GAL1
A0A6P7EIL1	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP
A0A836A2U0	Genetic suppressor element-like domain-containing protein	Gse1
A0A836CPT0	Ghrelin O-acyltransferase	MBOAT4

A0A836AFV6	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH
A0A835ZZX4	Glutamine synthetase	GLUL
A0A836CTM8	Glutathione peroxidase	GPX3
A0A6P3TM19	Glutathione S-transferase	GSTM3
A0A836ADQ3	Glutathione S-transferase	GSTM4
A0A6P7EDQ0	Glutathione S-transferase	GSTP1
A0A836APA1	Glutathione S-transferase	GSTM1*
A0A6P7EBK2	glutathione transferase	GSTM2
A0A6P9FRF8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
A0A6P7EQ24	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDHS
A0A835ZX42	Glycerate kinase	GLYCK
A0A836CZB0	Glycosyltransferase 2-like domain-containing protein	B4GALNT2*
A0A6P7EG37	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase	NMT1
A0A836AFC6	GPI ethanolamine phosphate transferase 3	PIGO*
A0A836D2Z4	G-protein coupled receptors family 1 profile domain-containing protein	*
W5P0Y7	G-protein coupled receptors family 3 profile domain-containing protein	GPR158
W5P292	G-protein coupled receptors family 3 profile domain-containing protein	GRM6
W5NQ51	GRIP domain-containing protein	GOLGA4
A0A836D4K9	GRIP domain-containing protein	GCC2*
A0A836ADX3	Guanylate cyclase	NPR1*
W5QAP7	Gypsy retrotransposon integrase-like protein 1	GIN1
A0A836AFS7	HAUS augmin-like complex subunit 3 N-terminal domain-containing protein	HAUS3*
A0A836AQ40	HAUS augmin-like complex subunit 3 N-terminal domain-containing protein	HAUS3*
A0A836CPZ1	HEAT repeat-containing protein 1	HEATR1*
A0A6P7DEW2	Heat shock protein beta-1	HspB1
A0A6P3EBB6	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2
A0A836AMB6	HECT-type E3 ubiquitin transferase	Herc2
A0A6P7DHF8	heparan sulfate-glucosamine N-sulfotransferase	NDST2*
A0A6P3ET13	Hexosyltransferase	B3GALT6*
A0A836A632	Histo-blood group ABO system transferase	*
A0A836A4U8	histone deacetylase	HDAC9*
A0A6P3DZG8	Histone H2A	H2ac20
A0A836D6V4	Histone H2A	LOC104987709*
A0A6P3DYW6	Histone H2B	LOC101121643

A0A6P3DZG3	Histone H2B	H2bc18
A0A6P3EHQ7	Histone H3	H3-3A; H3-3B
A0A836AAH0	histone H3-lysine(4) N-methyltransferase	RHEBL1*
W5QCD5	histone H3-lysine(4) N-methyltransferase	KMT2D
A0A6P3YIU5	histone H3-trimethyl-L-lysine(4) demethylase	Kdm5a*
A0A836CVN3	Histone H4	H4C
A0A835ZQK4	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1B	SETD1B
A0A835ZH82	HMG box domain-containing protein	SP100
A0A836A1V7	Homeodomain-only protein	*
W5PCT1	Hormone-sensitive lipase	LIPE
A0A6P7EXG8	HTH TFE/IIealpha-type domain-containing protein	GTF2E1*
W5NSU1	Hyaluronidase	LOC101107188
A0A6P3YQN7	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	HPRT1
A0A6P3TBL3	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1
A0A836D501	IF rod domain-containing protein	EFHD
A0A836D582	IF rod domain-containing protein	*
W5Q6E8	IF rod domain-containing protein	LOC101112555
A0A835ZXZ9	IF rod domain-containing protein	KRT31
A0A836A889	IF rod domain-containing protein	LOC104990467*
A0A836ACW5	IF rod domain-containing protein	KRT82*
A0A835ZW17	IF rod domain-containing protein	LOC112917758*
W5PZW9	IF rod domain-containing protein	KRT24
A0A836AAD1	IF rod domain-containing protein	*
A0A836A6R1	IF rod domain-containing protein	KRT14*
A0A836D7R3	IF rod domain-containing protein	Krt8_1*
A0A835ZVZ1	IF rod domain-containing protein	LOC101108147*
A0A836AA00	IF rod domain-containing protein	*
A0A836AJW9	IF rod domain-containing protein	KRT2.13*
A0A836AKW3	IF rod domain-containing protein	KRT83
W5Q643	IF rod domain-containing protein	LOC101110219
A0A835ZPM7	Ig-like domain-containing protein	*
A0A836CU14	Ig-like domain-containing protein	LOC102724971
W5QHZ5	Ig-like domain-containing protein	IGKV3-11*
A0A835ZQF6	Ig-like domain-containing protein	*

W5PSQ7	Ig-like domain-containing protein	IGL*
A0A836A6X3	Ig-like domain-containing protein	IGKC*
W5Q9D3	Immunoglobulin like and fibronectin type III domain containing 1	IGFN1
A0A835ZLG7	Immunoglobulin V-set domain-containing protein	TREML2
A0A6P3E860	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	ITPR2
A0A835ZP82	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	ITPR1*
W5NQ85	Insulin degrading enzyme	IDE
A0A6P7EK36	Integrator complex subunit 11	INTS11
B0FY4	Integrin beta-1	ITGB1
A0A835ZQ95	Interleukin	IL21
A0A836D783	Intersectin-1	ITSN1
A0A836D6E8	Intraflagellar transport protein 74 homolog	IFT74*
A0A836D776	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDH1
A0A836D4B0	J domain-containing protein	*
A0A836AK80	J domain-containing protein	Dnajc13*
W5P7F9	J domain-containing protein	*
A0A836AFM4	KAP NTPase domain-containing protein	KIDINS220
E3VW85	Keratin 83	LOC102185436*
A0A836A6U3	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10
W5Q160	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10
A0A836A0X2	Keratin, type I cytoskeletal 19	KRT19
A0A836A4W9	Keratin, type I cytoskeletal 25	*
A0A6P7DXP2	Keratin, type II cytoskeletal 5	Krt5
A0A836A7W4	Keratin, type II cytoskeletal 5	KRT82
A0A836A9Z1	Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7
A0A836AKV8	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8
W5PNN8	KICSTOR complex protein ITFG2	ITFG2
W5P7L9	Kinesin light chain 1	KLC1
A0A835ZKH9	Kinesin motor domain-containing protein	KIF4A
A0A836D1T9	Kinesin motor domain-containing protein	Kif1c*
W5PPN6	KxDL motif-containing protein 1	KXD1
A0A835ZXX5	Lactadherin	MFGE8*
A0A836CWA4	Lactotransferrin	LTF
A0A836APU3	Lamin-A	SEMA4A

W5PBA2	Large proline-rich protein BAG6	BAG6
A0A836D7B1	Large ribosomal subunit protein mL44	MRPL44*
A0A8K1EPA0	Leucine aminopeptidase 3	LAP3
W5PC58	Leucine zipper protein 2	LUZP2
A0A836CSZ9	LIM domain-containing protein 1	LIMD1*
A0A836CWP3	Lipid-binding serum glycoprotein N-terminal domain-containing protein	*
W5P8F9	Lipid-binding serum glycoprotein N-terminal domain-containing protein	BSP30C*
A0A836A858	Lipocalin/cytosolic fatty-acid binding domain-containing protein	*
W5PGV5	Lipocalin/cytosolic fatty-acid binding domain-containing protein	LOC101116018
A0A6P7DY93	L-lactate dehydrogenase	LDHB*
A0A835ZZ17	LRRNT domain-containing protein	Prelp*
A0A6P3EAC6	Lumican	LUM
A0A835ZJ24	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	*
A0A836AH72	Macro domain-containing protein	MACROH2A1*
A0A835ZR82	Macrophage migration inhibitory factor	MIF
W5NSU4	MAGE domain-containing protein	*
A0A836CNW0	MAGE domain-containing protein	LOC102175566*
W5PJQ7	Major facilitator superfamily (MFS) profile domain-containing protein	FLVCR1
A0A836AF62	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2	MOB3A*
W5PLK8	MARVEL domain-containing protein	LOC104989439*
A0A836AAA0	Medium-chain acyl-CoA ligase ACSF2, mitochondrial	ACSF2*
A0A835ZXR6	Melanoma antigen preferentially expressed in tumors-like	LOC525101*
A0A097GTW7	Membrane-associated progesterone receptor component 1	PGRMC1
A0A836A134	Membrane-bound transcription factor site-1 protease	MBTPS1*
A0A835ZS59	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 14	*
A0A6P9FRF3	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2*
A0A0H5FRK6	MHC class I antigen	Ovar-I
A0A1Z1VUM9	MHC class I antigen	HLA-A*
A0A835ZIF8	Microcephalin	MCPH1*
A0A836D6A3	Microtubule-actin cross-linking factor 1	MACF1
A0A836A4B6	Midasin	MDN1
A0A6P3E7U7	Mimecan	OGN
A0A836CS38	Mitochondrial uncoupling protein 4	SLC25A27
A0A836CZ10	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	MAP3K3*

W5NU05	Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle	MYLK2
A0A836QA7	Myosin light chain kinase, smooth muscle	MYLK*
O02827-2	Myosin light chain kinase, smooth muscle	MYLK
A0A6P7DER3	Myosin-11	MYH11*
W5PGT0	Myosin-11	MYH11
A0A836A8P0	Myosin-9	MYH9*
A0A836D5B5	Myotubularin phosphatase domain-containing protein	*
W5PF58	N-acetyltransferase ESCO1	ESCO1
A0A835ZNP2	N-acyl-aliphatic-L-amino acid amidohydrolase	ACY1
A0A836D6I3	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	LOC106503221
A0A6P3T810	Neprilysin	MME*
A0A836A1M3	Nesprin-1	SYNE1
A0A836CU78	Nipped-B protein	NIPBL
A0A836D8D7	non-specific serine/threonine protein kinase	WNK1
A0A836AG64	non-specific serine/threonine protein kinase	Pik3r4*
A0A836A264	non-specific serine/threonine protein kinase	RIPK3
A0A6P3EED7	non-specific serine/threonine protein kinase	Mark3
A0A835ZLC5	non-specific serine/threonine protein kinase	SLK*
A0A6P7DFE6	non-specific serine/threonine protein kinase	SIK1*
A0A6P3E6E8	NPC intracellular cholesterol transporter 2	NPC2
A0A836D7W2	Nuclear protein MDM1	MDM1*
A0A835ZYB4	Nucleoside diphosphate kinase	LOC101102072
A0A6P3TI37	Olfactory receptor	LOC109576841*
A0A836AA16	Ornithine aminotransferase	OAT*
A0A6P3YGL7	Outer dense fiber protein 2	ODF2
A0A835ZLR7	PABS domain-containing protein	*
A0A836AFU3	PABS domain-containing protein	SMS*
A0A836A2Z0	Paralemmin-3	PALM3*
A0A6P7E2H3	PDZ domain-containing protein	GIPC1
A0A836AJJ1	PDZ domain-containing protein	GRIP1*
W5Q038	PDZ domain-containing protein	AHNAK
A0A836CRE1	PDZ domain-containing protein 8	PDZD8*
A0A835ZLR4	Pecanex-like protein	PCNX2*
A0A836A7Z6	Peptidase M14 carboxypeptidase A domain-containing protein	CPA2*

A0A836D2Y1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	LOC112405579*
A0A6P9FQL1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	PPIE
A0A836A9G7	Peroxidase	*
A0A6P7E1M0	Peroxiredoxin-2	PRDX2
A0A836CRT0	Peroxiredoxin-5	PRDX5
A0A6P3CY24	Peroxiredoxin-6	PRDX6
A0A836D265	Peroxisomal ATPase PEX1	PEX1*
W5PQT5	PH domain-containing protein	AFAP1
A0A835ZLH0	Phosphatidic acid phosphatase type 2/haloperoxidase domain-containing protein	PLPP4
A0A6P3EBI4	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	LOC101114319
A0A836ADS4	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	PI4KB*
A0A836A4N7	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase	PIK3C2B
A0A836A7J2	Phospholipase	PLD2
A0A6P7DFA6	Phospholipid-transporting ATPase	ATP9B
A0A835ZPA5	Phospholipid-transporting ATPase	Atp8b1*
A0A836A8M8	phosphopyruvate hydratase	ENO1
A0A835ZHG8	polynucleotide adenylyltransferase	TENT5D*
A0A836CXA7	PRAME family member 8-like	LOC104996119*
A0A836D3P7	Proline-rich protein 15	PRR15*
A0A836D3G6	PROP1-like PPR domain-containing protein	LRPPRC*
A0A836D2V4	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS
A0A6P3EEM0	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1
A0A6P3DYK1	Proteasome subunit beta	PSMB2
A0A836AH07	Protein 4.1	EPB41*
A0A6P3T664	protein ABHD18 isoform X1	ABHD18
A0A836CXX4	Protein CASC3	CASC3*
A0A836CTC3	Protein disulfide-isomerase	PDIA3
A0A835ZYF0	Protein disulfide-isomerase	P4HB
W5Q9H2	Protein disulfide-isomerase	P4HB*
A0A6P7E144	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4*
A0A6P3YI89	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6
W5NXV9	Protein FAM102A	EEIG1*
A0A836AFI0	Protein FAM184A/B N-terminal domain-containing protein	FAM184B
A0A836AFW8	Protein kinase domain-containing protein	BMP2K

W5P178	Protein lin-28 homolog A	LOC101119530
A0A6P3YEX3	Protein O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	POMGNT1
A0A835ZN88	Protein POF1B	POF1B
A0A835ZLJ3	Protein Shroom2	SHROOM2*
A0A836D7Z2	Protein timeless homolog	TIMELESS*
A0A835ZVX0	Protein transport protein Sec31B	SEC31B
A0A836AGZ5	Protein Wnt	*
A0A836A5K7	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain-containing protein 2	PCMTD2
A0A836A442	protein-tyrosine-phosphatase	PTPRC
A0A836A8U4	Pyruvate kinase	PKM
A0A835ZYZ7	Rab11 family-interacting protein 4	RAB11FIP4*
A0A835ZSD1	RAI1-like domain-containing protein	Edrf1*
A0A835ZVZ5	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger-containing protein 1	RBCK1*
A0A835ZR54	Ras-related protein Rab-12	Rab12
A0A836AFG4	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS1	RALGPS1
A0A836A0P0	Rho guanine nucleotide exchange factor 7	Arhgef7*
A0A6P3CX22	Rho-related GTP-binding protein RhoH	RHOH
A0A835ZYH6	Ribosomal protein eL8/eL30/eS12/Gadd45 domain-containing protein	LOC101103352
A0A6P3EGH3	Ribosome maturation protein SBDS	SBDS
A0A836A5A7	Ribosome receptor lysine/proline rich domain-containing protein	RRBP1*
W5NXC7	RNase H type-1 domain-containing protein	*
A0A835ZUQ4	RRM domain-containing protein	*
W5NYJ6	RRM domain-containing protein	Hnrnpa1
A0A6P3EH89	RRM domain-containing protein	RBM3*
A0A6P7EUI9	RRM domain-containing protein	Esrp2
A0A835ZZ86	RZZ complex subunit KNTC1/ROD C-terminal domain-containing protein	KNTC1*
A0A6P3EFJ7	S100/CaBP-9k-type calcium binding subdomain domain-containing protein	S100A13*
A0A6P3E2K1	S-adenosylmethionine synthase	MAT2A*
W5Q0V0	SAM domain-containing protein	PPFIA2
A0A836D8F7	SAP domain-containing protein	MKL1*
A0A835ZS20	SAP domain-containing protein	THEX1*
A0A836A3Q4	Secretogranin-1	CHGB*
A0A6P3TY83	Selenoprotein O	LOC101109989
A0A835ZKX9	Septin	SEPTIN1

W5PM54	Serine/threonine-protein kinase Kist	UHMK1
W5PF65	Serotransferrin	TF
A0A835ZPL0	Serpin domain-containing protein	LOC102174166
A0A836CTG3	Serpin domain-containing protein	*
W5Q0X5	Serpin domain-containing protein	LOC101115576
W5PHP7	Serpin domain-containing protein	LOC102174926
W5NVB2	Serpin domain-containing protein	LOC101111083
A0A835ZWC2	Serpin domain-containing protein	SERPINB1
A0A835ZQA3	Serpin domain-containing protein	*
A0A835ZYK2	Serpin domain-containing protein	LOC102186111*
A0A6P3TB01	Signal recognition particle 54 kDa protein	SRP54
A0A836AQP3	Signal recognition particle receptor subunit beta	SRPRB
A0A6P3T625	Sm domain-containing protein	ATXN2L*
A0A835ZPI6	Small acidic protein-like domain-containing protein	KNOP1*
A0A6P3TH07	small monomeric GTPase	RAP1A
A0A836D474	Small ribosomal subunit protein uS5 C-terminal domain-containing protein	*
A0A836CW72	Small ribosomal subunit protein uS7	Rps5
A0A836D0Y4	Solute carrier family 53 member 1	*
W5PMC6	SPATA31/FAM205 domain-containing protein	*
A0A836AHX8	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	SPTA1*
A0A6P3YKN4	Spectrin beta chain	SPTBN1
A0A836AI12	Spermatid perinuclear RNA-binding protein	LOC107152107*
A0A6P3TCL9	Spermatogenesis-associated protein 6 N-terminal domain-containing protein	SPATA6
A0A836D5K5	SRCR domain-containing protein	LOC109558319*
A0A6P7DC98	SRP54-type proteins GTP-binding domain-containing protein	SRPRA*
A0A836AJX3	Stabilin-2	STAB2
A0A6P3E8H2	Sulfatase N-terminal domain-containing protein	ARSA
A0A6P9FRH0	Superoxide dismutase	SOD2*
B9VGZ6	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1
A0A836AH44	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	*
W5NQ68	SZT2 subunit of KICSTOR complex	SZT2
A0A836D7I4	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3*
W5PU33	T-complex protein 1 subunit zeta	LOC113909557*
W5Q3K0	Testis-expressed protein 35	TEX35

A0A836D238	Tetratricopeptide repeat protein 37	SKIC3*
A0A836CVE0	THAP-type domain-containing protein	LOC123613374
A0A836AMC8	Thioredoxin domain-containing protein	LOC103268588*
A0A6P7DFD8	Thioredoxin domain-containing protein	TXNDC11
A0A6P7DLD5	thioredoxin-dependent peroxiredoxin	PRDX4
A4D7V8	Thyroid nuclear factor 1	NKX2-1
W5Q754	Titin	TTN
A0A6P3EA80	Transgelin	TAGLN
A0A6P7DNP3	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP*
A0A836A148	Translationally-controlled tumor protein	TPT1
A0A835ZVX8	Transmembrane channel-like protein	TMC4
A0A835ZZL4	Transmembrane protein 132D	TMEM132D
A0A836AN88	Transmembrane protein 169	TMEM169*
A0A836AGL7	Transmembrane protein 237	TMEM237
A0A836A9P0	Transmembrane protein 87B	FBLN7*
A0A6P7DCR0	Transthyretin	TTR
A0A6M6R7Y5	Triosephosphate isomerase	TPI1
A0A6P3TI22	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1
A0A6P3E0T4	Tropomyosin beta chain	TPM2
A0A836D7T3	Tubulin alpha chain	TUBA1A
A0A6P3CX09	Tubulin alpha chain	TUBA4A
D0VWZ0	Tubulin alpha chain	TUBA1A
A0A836D5A0	Tubulin alpha-1C chain	LOC108928243
A0A6P7DDI9	Tubulin beta chain	TUBB6*
A0A836CX36	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	*
A0A836AAJ5	Tyrosine-protein kinase	JAK2
A0A6P7DW64	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	Snrnp200
A0A6P7D544	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP13
A0A835ZMX1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp11
A0A6P7E7B3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP1
W5PIP3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	USP47
P0C276	Ubiquitin-ribosomal protein eL40 fusion protein	UBA52
A0A836AGA8	UBZ1-type domain-containing protein	TANK
A0A6P3E9I3	Uncharacterized protein	*

W5NTT7	Uncharacterized protein	COL1A2
A0A6P7DXN6	Uncharacterized protein	KRT18 *
A0A6P3TAY9	Uncharacterized protein	AKAP4
A0A6P3E858	Uncharacterized protein	*
A0A6P3CWZ0	Uncharacterized protein	CHCHD3*
W5P767	Uncharacterized protein	*
A0A836A0Z8	Uncharacterized protein	*
A0A6P7EVA9	Uncharacterized protein	PHF21A
A0A6P7EFI0	Uncharacterized protein	UBE2O
A0A6P3TK65	Uncharacterized protein	LCP1*
A0A6P3E666	Uncharacterized protein	TTC1
A0A6P3YNZ0	Uncharacterized protein	RBM6
A0A836A6I0	Uncharacterized protein	*
A0A6P7D4K8	Uncharacterized protein	PTPN23
A0A6P7DHI2	Uncharacterized protein	ZSWIM8*
A0A6P7EWZ3	Uncharacterized protein	FBXL7
A0A836CPT4	Uncharacterized protein	*
A0A6P3E9I2	Uncharacterized protein	SETX
A0A6P3YFK0	Uncharacterized protein	PPP2R3A
A0A835ZYA2	Uncharacterized protein	*
W5Q659	Uncharacterized protein	KRT74
A0A6P3TF62	Uncharacterized protein	RBM7
A0A6P3T8D6	Uncharacterized protein	HLTF*
W5PC22	Uncharacterized protein	*
A0A6P7DAB0	Uncharacterized protein	ZBTB38
A0A6P3E171	Uncharacterized protein	TLN1*
A0A836A6Q5	Uncharacterized protein	*
A0A6P3EE37	Uncharacterized protein	SCYL3*
W5QDR7	Uncharacterized protein	DUSP21
A0A6P7EYV7	Uncharacterized protein	COMMD9*
A0A6P3EIU6	Uncharacterized protein	LOC100526781*
A0A6P3E4M2	Uncharacterized protein	LMNB1
A0A836AMW3	Uncharacterized protein	GOLGB1*
A0A6P7DFN2	Uncharacterized protein	TMEM114*

A0A6P3EAU7	Uncharacterized protein	PLEK*
W5PLG5	Uncharacterized protein	Rprml*
W5NQL4	Uncharacterized protein	TCEAL3
A0A6P7DG82	Uncharacterized protein	LOC110121709*
A0A835ZPQ9	Uncharacterized protein	*
A0A6P3YN16	Uncharacterized protein	ADAMTS9*
A0A836A8C0	Uncharacterized protein	SMARCE1*
A0A836CUR8	Uncharacterized protein	*
A0A6P3T3X5	Uncharacterized protein	*
A0A6P7EP55	Uncharacterized protein	RAB3GAP2*
W5NTR5	Uncharacterized protein	*
A0A6P7DT11	Uncharacterized protein	BRD3*
W5PWB2	Uncharacterized protein	ANKRD23
A0A6P3EGE3	Uncharacterized protein	YLPM1
A0A6P3EN47	Uncharacterized protein	RAB39B*
A0A6P3ENB1	Uncharacterized protein	*
A0A6P3EHN8	Uncharacterized protein	GAB1
A0A835ZK52	Uncharacterized protein	LOC109675513*
A0A6P3TMN9	uncharacterized protein C20orf96 homolog	C13H20orf96
A0A836AD88	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	VPS13C
W5P5M8	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	VPS26A
A0A6P3EK74	Vimentin	VIM
Q9MZA9	Vimentin	VIM
A0A6P7DH72	Vinculin	Vcl
A0A836A4N3	Vitamin D-binding protein	GC
A0A836AQX9	Voltage-gated potassium channel subunit beta-1	KCNAB2
A0A836AQI1	VWFA domain-containing protein	vWFA*
A0A836D8W5	VWFA domain-containing protein	COL6A2*
W5P5B1	Winged helix Storkhead-box1 domain-containing protein	STOX1
W5Q8Z4	Zinc finger MYND-type containing 8	ZMYND8
A0A835ZQ26	Zinc finger piccolo-type domain-containing protein	BSN
A0A836CZA9	Zinc finger protein ZFPM2	ZFPM2
A0A836D0R2	Zinc finger-containing ubiquitin peptidase 1	ZUP1*
W5Q0M0	Zona pellucida-binding protein 1	ZPBP

A0A836D6M1	Zyxin	ZYX
A0A6P7D124	14-3-3 domain-containing protein	YWHAH*
A0A6P7EKL3	14-3-3 protein epsilon	YWHAE
A0A836A0S9	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ
A0A836A4V0	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase	Plcb4*
A0A836D448	28S ribosomal protein S2, mitochondrial	MRPS2*
A0A6P3ESK7	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	RIDA
A0A836CX12	40S ribosomal protein S25	*
A0A6P7DTF9	60S ribosomal protein L7a	RPL7A*
A0A6P3EAN0	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5