

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

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

PAULA ZANIN RATTES

Botucatu, SP
Novembro – 2025

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

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

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

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

Botucatu, SP
Novembro – 2025

R237a Rattes, Paula Zanin
Avaliação do perfil proteico de tecido testicular de carneiros submetidos a insulação escrotal / Paula Zanin Rattes. -- Botucatu, 2025
64 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

1. Estresse térmico testicular. 2. Insulação escrotal. 3. Proteoma. I. Título.

Nome do autor (a): Paula Zanin Rattes

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

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

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro Titular

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

Profa. Dra. Thaisy Tino Dellaqua

Membro Titular

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

Data da defesa: 07 de Novembro de 2025.

DEDICO,

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Rachel Carson

RESUMO

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

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

Palavras-chave: estresse térmico; proteoma; testículo

ABSTRACT

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

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

Keywords: thermal stress; proteome; testis

SUMÁRIO

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

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

2 **2.1. Anatomia e fisiologia testicular**

3 Nos carneiros, o sistema reprodutor masculino é composto pelos
4 testículos, pelos epidídimos e pelas glândulas sexuais acessórias, que incluem
5 as glândulas vesiculares, a próstata e as glândulas bulbouretrais. Essas
6 estruturas atuam de forma integrada para formar, maturar, armazenar e
7 transportar os espermatozoides até a ejaculação. Em ruminantes, o escroto
8 encontra-se na região inguinal, e os testículos permanecem suspensos
9 verticalmente em relação ao eixo corporal (12). Além de produzir os gametas
10 masculinos, os testículos também sintetizam hormônios esteroides,
11 especialmente androgênios, exercendo assim funções exócrinas e endócrinas
12 (13).

13 O escroto envolve os testículos e os epidídimos e é revestido por duas
14 lâminas serosas derivadas do peritônio, denominadas túnica vaginal parietal e
15 visceral. Internamente, o testículo é circundado pela túnica albugínea,
16 constituída por tecido conjuntivo denso associado a fibras musculares lisas.
17 Dessa túnica partem septos que convergem para o mediastino e subdividem o
18 órgão em lóbulos. Cada lóbulo possui de dois a cinco túbulos seminíferos
19 altamente enovelados, local onde ocorre a formação dos espermatozoides (12).
20 Após sua produção, os espermatozoides deslocam-se pelos túbulos retos, rete
21 testis e ductos eferentes até atingirem o ducto epididimário (14).

22 O epidídimo é constituído por um único ducto longo e sinuoso, que se
23 organiza em três regiões: cabeça, corpo e cauda. A maturação funcional dos
24 espermatozoides ocorre principalmente nas regiões cranial e medial, enquanto
25 a cauda atua como principal sítio de armazenamento até a ejaculação. Da cauda
26 epididimária, o ducto continua como ducto deferente, que segue pelo cordão
27 espermático, atravessa o canal inguinal e penetra na cavidade abdominal,
28 unindo-se ao ducto excretor da glândula vesicular para formar o ducto
29 ejaculatório, que desemboca na uretra (12).

30 A espermatogênese é um processo contínuo e ordenado que ocorre no
31 interior dos túbulos seminíferos e envolve três eventos principais:
32 espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. Nos ovinos, sua duração é de
33 aproximadamente 47 dias (15,16). Inicialmente, as espermatogônias passam por
34 sucessivas divisões mitóticas e originam espermatócitos primários, que entram

em meiose e dão origem às espermatídes haploides. Na etapa final, a espermiogênese, as espermatídes sofrem transformação morfológica e funcional até se tornarem espermatozoides, os quais são liberados das células de Sertoli no processo denominado espermição (13).

2.2. Termorregulação

Os animais homeotérmicos adotam um conjunto de estratégias para regular a temperatura corporal, assegurando o bom funcionamento do organismo e o equilíbrio dos processos bioquímicos, enzimáticos e fisiológicos (17). Essas estratégias são conhecidas como termorregulação.

A termorregulação ocorre por meio de mecanismos internos (autônomos e endócrinos) e externos (comportamentais), todos coordenados pelo sistema nervoso central, especialmente pelo hipotálamo. Esse centro regulador detecta alterações na temperatura corporal e ambiental, desencadeando respostas imediatas via sistema nervoso autônomo e modulando a secreção hormonal com o objetivo de conservar ou dissipar calor, mantendo assim a homeostase (18).

Os principais mecanismos fisiológicos, a nível do sistema autônomo (respostas imediatas), para dissipação de calor em animais são a vasodilatação periférica, a sudorese, e a polipneia (19). Em contrapartida, os principais mecanismos para a conservação de calor são vasoconstrição periférica, piloereção, tremores musculares e termogênese sem presença de tremores (19,20).

O sistema endócrino, por sua vez, desencadeia respostas de médio a longo prazo, regulando a produção metabólica de calor. Os hormônios tireoidianos (T3 e T4) aumentam a taxa metabólica basal, estimulando a termogênese adaptativa (21). O cortisol e a leptina também desempenham papéis importantes no contexto do estresse térmico: o primeiro regula a resposta ao estresse, enquanto o segundo participa do balanço energético, modulando a ingestão alimentar e o metabolismo (19). Em bovinos, a elevação desses hormônios em situações de calor intenso reduz a ingestão de matéria seca, como forma de limitar o processo de termogênese (22).

Os mecanismos externos ou complementares destinados à mitigação dos efeitos relacionados ao calor intenso incluem alterações comportamentais, como

a busca por sombra, mudanças na postura corporal, imersão em água e até mesmo a modificação dos horários de atividade (19,23).

2.3. Estresse térmico testicular

Os testículos, são órgãos completamente sensíveis ao estresse térmico, e devem se manter de 3 a 5 °C abaixo da temperatura corporal (24) o processo de termorregulação desses órgãos é realizado pelo escroto, que fornece proteção física, e pelo cordão espermático.

O processo de termorregulação vascular ocorre devido ao íntimo contato entre a artéria testicular, responsável por levar sangue aos testículos, e uma exuberante rede de veias de pequeno calibre, encarregadas do retorno venoso testicular, conhecida como plexo pampiniforme (25). Esse arranjo funciona como um sistema de troca de calor, que simultaneamente resfria o sangue arterial proveniente do corpo e aquece o sangue venoso que retorna da gônada (13).

A túnica dartos e o músculo cremaster também participam da termorregulação, pois permitem a contração e o relaxamento dos testículos, aproximando-os ou afastando-os do corpo conforme necessário. O músculo cremaster, por sua vez, também contribui para o retorno sanguíneo no plexo pampiniforme, aumentando a eficiência da troca de calor no cone vascular do testículo (13).

Um estudo demonstrou que o estresse térmico testicular agudo compromete a espermatogênese, causando redução da motilidade espermática, além do aumento na proporção de espermatozoides com alterações morfológicas. Adicionalmente, há prejuízo nas propriedades de membrana plasmática e acrossomal, indicando falhas na integridade estrutural dos espermatozoides. No epidídimo, o prejuízo ocorre no processo de maturação espermática, contribuindo para a perda de viabilidade celular, enquanto que no tecido testicular há degeneração do epitélio seminífero, redução no número de células germinativas e indícios de apoptose (26)

2.3.1. Modelos experimentais para indução de estresse térmico

Diversas metodologias já foram empregadas em estudos sobre o estresse térmico testicular, incluindo abordagens que envolvem estresse sistêmico, nas quais os animais são expostos integralmente ao calor, e outras que se

1 concentram exclusivamente na exposição do escroto às condições térmicas
2 adversas (27).

3 A insulação escrotal é um método eficaz para mimetizar o aumento da
4 temperatura testicular em animais (28–32). Em bovinos, um estudo utilizando
5 fralda descartável e saco de tecido envolvendo o escroto provocou elevação
6 térmica suficiente para comprometer a espermatogênese (33). Outro estudo,
7 com fralda descartável fixada por fita adesiva, registrou aumento de
8 aproximadamente 3 °C na temperatura intratesticular (34). Em ovinos, a literatura
9 descreve técnicas como o uso de bolsas confeccionadas com tecido
10 impermeável na parte externa e material não abrasivo (espuma) na parte interna
11 (35) e uso de fraldas descartáveis e fitas adesivas, que elevaram a temperatura
12 da superfície testicular em cerca de 5 °C (26).

13 Adicionalmente, há relatos na literatura que abordam o estresse térmico
14 sistêmico, o qual provoca, conseqüentemente, o aumento da temperatura
15 testicular. Entre os modelos utilizados, destaca-se o uso de câmaras climáticas
16 com temperaturas elevadas, aplicadas em suínos (36), coelhos (37) e
17 camundongos (38). Outro modelo amplamente empregado é a imersão em água
18 aquecida, especialmente em estudos com camundongos, que também resulta
19 na elevação da temperatura testicular e em impactos significativos sobre a
20 espermatogênese (39–41).

21 Tanto o método de insulação restrito ao testículo quanto o de insulação
22 sistêmica são eficazes para induzir estresse térmico em machos, embora
23 apresentem vantagens e limitações distintas. A insulação escrotal é uma
24 metodologia mais acessível, pois requer poucos materiais de baixo custo e não
25 demanda um ambiente altamente controlado. No entanto, sua principal
26 desvantagem é a limitação em mimetizar com precisão as condições reais de
27 exposição ao calor, uma vez que apenas o escroto é aquecido, não permitindo
28 a avaliação das respostas fisiológicas sistêmicas do animal, como ocorre nas
29 abordagens de aquecimento corporal total.

30 Por outro lado, os modelos sistêmicos, como o uso de câmaras
31 bioclimáticas, apresentam desafios logísticos significativos, especialmente
32 quando aplicados a animais de grande porte, como bovinos. O método de
33 imersão em água aquecida também se mostra inviável para grandes animais,
34 restringindo seu uso a espécies de pequeno porte, como camundongos.

2.3.2. Respostas moleculares ao estresse térmico

As proteínas são moléculas sintetizadas nos ribossomos a partir da informação genética contida no DNA, que é transcrita em RNA mensageiro e, posteriormente, traduzida em uma sequência de aminoácidos. Esses aminoácidos se ligam formando uma cadeia linear, unida por ligações peptídicas, que compõem a estrutura da proteína. Essas moléculas desempenham uma ampla variedade de funções celulares, como catalisar reações metabólicas, compor a estrutura das células e modular a expressão gênica (42). Embora os genes sejam responsáveis por codificar as proteínas, são as próprias proteínas que regulam a expressão gênica, determinando o momento, o modo e a intensidade com que os genes são expressos.

O proteoma, por sua vez, refere-se ao conjunto completo de proteínas que podem ser expressas por um genoma, célula, tecido ou organismo em determinada condição. Esse conjunto inclui não apenas as proteínas diretamente codificadas pelos genes, mas também aquelas originadas de processos pós-transcricionais e pós-traducionais (43). O proteoma é dinâmico e sofre alterações constantes, especialmente em resposta a condições ambientais adversas, como forma de garantir a sobrevivência celular (44).

Com o objetivo de compreender melhor o perfil proteico dos tecidos e do organismo como um todo, tanto em condições fisiológicas quanto em situações de alteração funcional das proteínas, surge a proteômica, o estudo abrangente desse conjunto molecular envolvido em inúmeros processos biológicos (43). A proteômica permite investigar as proteínas presentes em unidades biológicas, incluindo sua descrição, quantificação, variações dependentes do genótipo, análises diferenciais ou comparativas (alterações decorrentes de estímulos ambientais ou do desenvolvimento), modificações pós-traducionais e interações proteicas (45).

Estudos demonstram que o estresse térmico modula a expressão de genes essenciais para a manutenção da integridade espermática e para a resposta ao estresse oxidativo, como as proteínas pertencentes à família das *heat shock proteins* (HSPs). Essas proteínas atuam como chaperonas moleculares, auxiliando no dobramento adequado das proteínas, evitando a formação de agregados e contribuindo para a recuperação de proteínas danificadas pelo estresse térmico (9,46).

Quando o estresse térmico testicular ocorre, há uma série de genes que são ativados na tentativa de retomar a homeostase testicular (Figura 1). As respostas iniciais deste evento são o aumento das proteínas mal dobradas e das espécies reativas de oxigênio, ativando a via NRF2, aumentando a transcrição de genes antioxidantes GPX1 e SOD. Na tentativa de regular o meio intracelular e recuperar a função das proteínas, as chaperonas moleculares (HSPs) são ativadas. Todos esses mecanismos são ineficientes e na tentativa de reparar o DNA fragmentado, a célula desencadeia a transcrição da proteína P53, aumentando a transcrição do gene BAX, aumentando a relação BAX/BCL-2, que, através do mecanismo intrínseco, libera o citocromo C pelas mitocôndrias, ativando a APAF1 (fator de ativação de protease apoptótica), que ativa caspases 2 e 9, que consequentemente ativa a caspase efetora, a caspase 3. No mecanismo extrínseco, a P53 estimula a transcrição gênica e formação do receptor de membrana celular FAS que se une ao seu ligante (FasL), e induzem a apoptose (23,47).

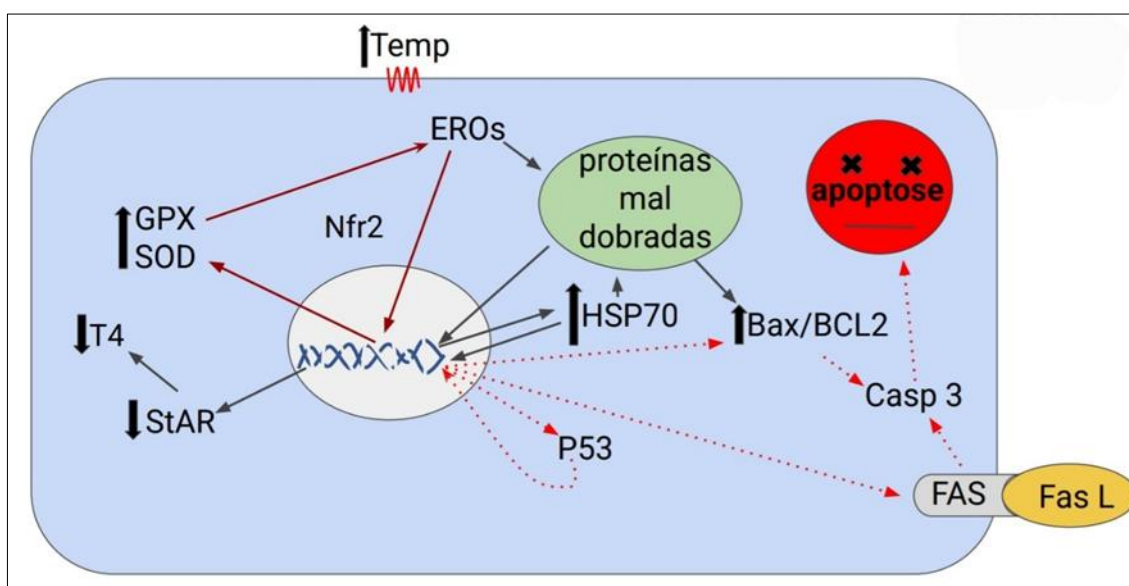


Figura 1. Modelo teórico das respostas celulares moleculares ao estresse térmico testicular.

Em ovinos, o estresse térmico sazonal também pode alterar a expressão de genes antioxidantes e reguladores da espermatogênese, fundamentais para a defesa contra espécies reativas de oxigênio. A redução na expressão desses genes aumenta a susceptibilidade das células germinativas ao estresse oxidativo, levando à peroxidação lipídica, danos à membrana celular,

1 fragmentação do DNA e ativação de vias apoptóticas. Na tentativa de
2 recuperação, concomitantemente a esses processos, observa-se também um
3 aumento na expressão de genes relacionados à apoptose e à resposta
4 imunológica (48).

5 O estresse térmico provoca alterações significativas no perfil proteico dos
6 testículos e do sêmen, influenciando diretamente a espermatogênese e a
7 qualidade espermática. Em bovinos, estudos demonstram que a expressão de
8 proteínas da família *heat shock proteins* (HSPs), incluindo HSP70 e HSP90, é
9 modulada em resposta à hipertermia, atuando na manutenção da integridade
10 proteica e na proteção contra o estresse oxidativo (9,49). Além disso, foram
11 identificadas alterações em proteínas envolvidas na motilidade e na integridade
12 da membrana espermática, evidenciando a sensibilidade das células
13 germinativas à elevação da temperatura testicular. Em ovinos, observa-se uma
14 mudança no perfil de proteínas antioxidantes, metabólicas e estruturais,
15 incluindo HSPs, indicando que a hipertermia induz adaptações moleculares
16 complexas no tecido testicular e no plasma seminal (10,11).

17 Complementando esses achados, o plasma seminal de ovinos foi
18 investigado sob condições de estresse térmico, revelando uma redução na
19 expressão de proteínas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD1).
20 Essa diminuição compromete a capacidade dos espermatozoides de neutralizar
21 espécies reativas de oxigênio, aumentando o risco de danos oxidativos ao DNA
22 e às membranas celulares. O mesmo estudo também identificou alterações em
23 proteínas relacionadas à motilidade e à maturação espermática, reforçando a
24 importância do proteoma seminal na avaliação da fertilidade sob condições de
25 calor (11).

27 **3. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

28 **3.1. Hipótese(s)**

29 A hipótese central deste estudo é que o aquecimento testicular agudo,
30 induzido pela insulação escrotal por períodos de 24 ou 48 horas, altera
31 significativamente o perfil proteico testicular de carneiros, promovendo
32 mudanças nas proteínas associadas a processos celulares essenciais, como
33 resposta ao estresse térmico, metabolismo energético, apoptose e
34 espermatogênese.

3.2. Objetivo

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

4. REFERÊNCIAS¹

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

¹ Referências organizadas de acordo com as regras de Vancouver

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

1 **ARTIGO CIENTÍFICO**

2 **Efeitos do estresse térmico sobre o proteoma testicular de**
3 **carneiros**

4
5 *Effects of Thermal Stress on the Testicular Proteome of Rams*

6
7 Rattes, P.Z.¹; Rizzoto, G².; Carvalho, M. G. ¹; Pupulim, A. G. R¹; Souza, F.F.¹;
8 Ferreira, J. C. P. ^{1,*}

9
10 ¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ,
11 Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

12 ²Departamento de Medicina Interna, Reprodução e Medicina Populacional,
13 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Gent, Gent, Flandres
14 Oriental, Bélgica

15
16 *Autor correspondente: João Carlos Pinheiro Ferreira
17 E-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br

18 **Resumo**

19 Este estudo investigou as alterações no proteoma testicular de ovinos
20 submetidos à insulação escrotal aguda (até 48 horas), ao longo dos primeiros 14
21 dias após o estímulo térmico. Foram utilizados 25 carneiros reprodutivamente
22 ativos (Santa Inês × Dorper), distribuídos em cinco grupos experimentais. O
23 grupo controle foi castrado sem exposição ao calor, enquanto os demais foram
24 castrados após 24h, 48h, 7 dias ou 14 dias do início da insulação. Os testículos
25 foram coletados, processados e o proteoma analisado por espectrometria de
26 massa. A análise estatística foi realizada na plataforma MetaboAnalyst 6.0,
27 utilizando o teste t de Student ($FDR < 0,05$) e análise de componentes principais.
28 Proteínas com $\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$ e $FDR < 0,05$ foram consideradas diferencialmente
29 abundantes. A interseção das proteínas entre os grupos foi avaliada por Venn
30 Diagram, e o enriquecimento funcional das proteínas dos grupos 24h, 48h, 7d e
31 14d foi realizado no ShinyGO, com visualização dos resultados em gráficos
32 Sankey. Nas fases iniciais (24h e 48h), observaram-se poucas proteínas
33 diferencialmente abundantes e sobreposição entre os grupos, com ativação de
34 vias antioxidantes e metabólicas (PRDX2, PRDX4, PGK1). Após 7 dias, surgiram
35 padrões de agrupamento e modulações em proteínas relacionadas à
36 homeostase redox, chaperonas e remodelação nuclear (HSPA1L, RPRD1A,
37 H3F3A), indicando efeitos sobre reprodução e maturação gamética. Aos 14 dias,
38 as alterações se intensificaram, com separação clara dos perfis e
39 enriquecimento funcional em atividades catalíticas, ligação a nucleotídeos,
40 reorganização do citoesqueleto e remodelação nuclear (HSPB1, PRDX4, PGK1,
41 TUBA1B, TUBA8, RPRD1A). Conclui-se que a insulação escrotal aguda provoca
42 alterações proteômicas progressivas e duradouras no testículo de ovinos,
43 afetando mecanismos antioxidantes, reparo proteico e função reprodutiva, com
44 implicações relevantes para o manejo em ambientes de estresse térmico.

45

46 **Palavras-chave: estresse térmico; proteômica; testículo.**

47 1. Introdução

48 As alterações climáticas vêm se intensificando progressivamente,
49 caracterizando-se pelo aumento da temperatura média, maior frequência de
50 ondas de calor e irregularidade das precipitações (1). Esses fenômenos afetam
51 a reprodução (2), causam alterações fisiológicas importantes para o bem-estar
52 e, conseqüentemente, diminuem a produtividade dos animais. Entre os sistemas
53 fisiológicos mais sensíveis ao estresse térmico e às variações ambientais está o
54 eixo reprodutivo, cuja estabilidade depende do equilíbrio hormonal e da
55 integridade dos processos espermatogênicos.

56 Os ovinos apresentam uma sazonalidade reprodutiva bem definida, sendo
57 considerados animais de reprodução estacional de dias curtos, com maior
58 atividade sexual e espermatogênese durante o outono e inverno (3). Fora do
59 período reprodutivo esses animais apresentam uma queda significativa nos
60 níveis séricos de testosterona, redução da gametogênese e diminuição do peso
61 e volume testicular (4,5). Contudo, essa dinâmica reprodutiva, já naturalmente
62 modulada por fotoperíodo, pode ser ainda mais influenciada por fatores
63 ambientais adicionais, como o aumento da temperatura e o estresse térmico
64 decorrente das mudanças climáticas, alterando a eficiência reprodutiva ao longo
65 do ano.

66 Nesse contexto, a capacidade de manter a estabilidade térmica corporal
67 torna-se um determinante fisiológico central para a preservação da função
68 reprodutiva. Os ovinos são animais homeotérmicos, ou seja, utilizam
69 mecanismos internos (autônomos e endócrinos) e externos (comportamentais)
70 na tentativa de regular a temperatura corporal, dissipando ou conservando calor
71 e mantendo a homeostase (6). A faixa de termoneutralidade nesta espécie se
72 encontra entre 12 e 32 °C (7), e quando ultrapasso esse limite, acima de 35 °C
73 a termorregulação é comprometida e mecanismos compensatórios são ativados,
74 e se ineficientes o animal apresenta hipertermia, causando comprometimento
75 fisiológico, afetando seu desempenho (8,9).

76 Em machos, a elevação da temperatura corporal provoca hipertermia
77 escrotal, comprometendo a homeostase testicular, que depende de
78 temperaturas entre 3 a 5 °C abaixo da temperatura corporal para que a
79 espermatogênese ocorra de forma eficiente (10). Quando ocorre o estresse
80 térmico testicular, há redução da espermatogênese, aumento da degeneração

81 germinativa, desorganização dos túbulos seminíferos e diminuição da qualidade
82 espermática (11,12)

83 Numa abordagem molecular, o estresse térmico testicular induz a
84 expressão diferencial de proteínas relacionadas à resposta ao estresse, como
85 as *heat shock proteins* (HSPs), ao metabolismo oxidativo, à apoptose e ao reparo
86 celular, refletindo a tentativa do testículo de restabelecer a homeostase (13–16).
87 Essas alterações no proteoma testicular representam respostas adaptativas e
88 compensatórias frente à agressão térmica, mas, quando persistentes ou
89 intensas, podem comprometer de forma irreversível a função reprodutiva do
90 macho.

91 A espermatogênese é altamente sensível à temperatura, e a manutenção
92 da homeostase térmica testicular é essencial para a integridade funcional das
93 células germinativas (17). Estudos prévios indicam que o estresse térmico pode
94 modular a expressão de proteínas relacionadas à proteção celular, apoptose,
95 metabolismo e integridade espermática (14,18–21). No entanto, há escassez de
96 dados sobre o impacto agudo da hipertermia testicular no proteoma do órgão,
97 especialmente em pequenos ruminantes. A caracterização dessas alterações
98 pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de adaptação e dano
99 térmico, além de fornecer subsídios para estratégias de mitigação e preservação
100 da fertilidade em ambientes de alta temperatura.

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

104

105 **2. Material e métodos**

106 Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)
107 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu,
108 conforme atestado pelo protocolo número 041/2021.

109

110 **2.1. Design experimental**

111 Foram utilizados 25 carneiros adultos mestiços saudáveis (Santa Inês x
112 Dorper), com idade média de 18 meses e peso vivo médio 55 kg. A seleção dos
113 machos foi realizada a partir de exames andrológicos (22), sendo considerados
114 aptos a participar do estudo os animais que apresentaram motilidade

115 espermática total acima de 75%, mensurada por análise computadorizada
116 (Hamilton Thorne Sperm Analyzer – Hamilton Thorne - USA), e morfologia
117 espermática normal acima de 95%. A avaliação da morfologia espermática foi
118 realizada por microscopia de contraste de fase (Microscópio Leyca – DM 500,
119 Wetzlar – Germany).

120 Os animais selecionados, foram identificados e acomodados em trios nas
121 baias, com livre acesso ao cocho e bebedouro, sendo alimentados duas vezes
122 ao dia, com feno de capim Tifton 85 (*Cynodon* spp.) e concentrado comercial de
123 acordo com as recomendações do NRC (2000) para esta categoria animal.

124 O experimento foi realizado durante o fim do outono e início do inverno,
125 nas instalações do aprisco do Departamento de Cirurgia Veterinária e
126 Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
127 Universidade Paulista (FMVZ - UNESP), localizada na cidade de Botucatu, no
128 estado de São Paulo, Brasil.

129

130 2.2. *Insulação escrotal*

131 Após a seleção e adaptação, os carneiros foram alocados aleatoriamente
132 em cinco grupos experimentais (n = 5/grupo; Figura 1) e submetidos à insulação
133 escrotal (IE) por até 48 h. Para tanto, o escroto foi envolvido em duas camadas
134 de fraldas infantis descartáveis, fixadas com fita adesiva (12). No grupo control,
135 os carneiros foram orquiectomizados sem que tenham passado por insulação
136 escrotal. O grupo 24h foi submetido à insulação escrotal por 24 horas e
137 orquiectomizado imediatamente ao término do período de insulação. O grupo
138 48h foi submetido à insulação escrotal por 48 horas, sendo orquiectomizado logo
139 após esse intervalo. Os grupos 7 dias e 14 dias foram submetidos à insulação
140 escrotal por 48 horas, sendo a orquiectomia realizada, respectivamente, aos 7 e
141 aos 14 dias após o início do procedimento de insulação escrotal.

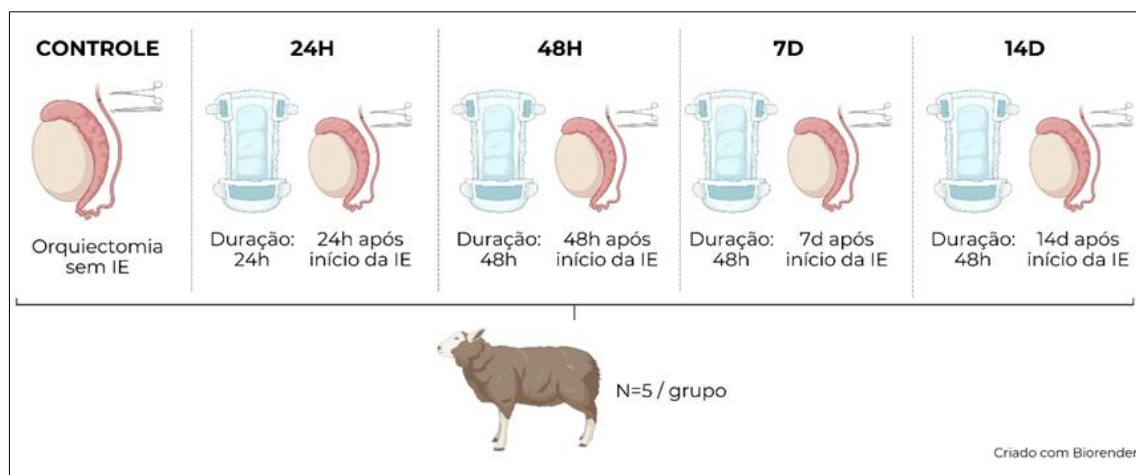


Figura 1. Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

2.3. Temperatura e monitoramento térmico

A temperatura e a umidade ambientais foram registradas a cada 10 minutos por um *datalogger* (HOBO Data Loggers U12-012, Onset® 77, Bourne, MA, EUA) durante toda a fase experimentas. As temperaturas mínima e máxima foram respectivamente 16 °C e 28,5 °C. A temperatura média do período experimental foi de 18,1°C e a umidade relativa foi de 60,8%.

A temperatura da superfície escrotal foi avaliada através de imagens obtidas através de uma câmera termográfica (Flir Modelo E53 24°, MSX®, Wilsonville, OR, USA), tais imagens eram capturadas imediatamente antes após a remoção do isolamento. Adicionalmente, a temperatura retal foi obtida com termômetro clínico imediatamente antes da colocação da fralda e imediatamente após a retirada desta.

2.4. Orquiectomia

Os carneiros foram castrados utilizando uma técnica semiaberta de orquiectomia. No pré-operatório, foram administrados por via intramuscular 40.000 UI/kg de penicilina G benzatina e 2,2 mg/kg de flunixin meglumine e 0,2 mg/kg de acepromazina intravenosa. Após 15 minutos, foram administrados 20 mL de lidocaína a 2% com epinefrina, divididos da seguinte forma: 5 mL em cada cordão espermático e 10 mL no local da incisão da bolsa escrotal. Em seguida, foi realizada a antisepsia pré-cirúrgica do escroto, e realização da orquiectomia.

Após a orquiectomia, os testículos foram isolados e fragmentos do órgão foram coletados e colocados em tubos criogênicos e devidamente identificados.

168 Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento
169 do processamento.

170

171 2.5. Análise do perfil proteico testicular

172 As amostras de tecido testicular foram descongeladas em banho de gelo,
173 pesadas (Shimadzu® AUY22, Kyoto, Japão) e acrescidas de tampão RIPA
174 contendo inibidores de proteases (150 mmol NaCl, 1% Triton X100, 1% sodium
175 deoxycholate, 0,1% SDS, 0,8 mmol EDTA, 1,0 µg/mL aprotinina, 1,0 µg/mL
176 leupeptina e 35,0 µg/mL PMSF em 50 mmol TRIS-HCl pH 7,2) na proporção de
177 0,2g para 500 µL.

178 A seguir, as amostras foram sonicadas por cinco séries (Sonicador
179 BRANSON - Digital Sonifier®, Danbury, CT, EUA), em banho de gelo, com probe
180 de 3,0 mm, amplitude de 20%, durante 1 minuto, com intervalos de 1 minuto
181 entre as séries. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf® -
182 Centrifuge 5810 R, Hamburgo, Alemanha), por 30 minutos a 10.000Xg a 4 °C. O
183 sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteína total foi determinada
184 em nanoespectrofotômetro (NanoDrop One® 2000 Thermo Fisher Scientific™,
185 São Paulo, São Paulo, Brasil) programado na função *proteins* A280.

186 Amostras contendo 50 µg de proteína foi submetida ao 1D-SDS-PAGE
187 em gel de separação a 10% de poliacrilamida. A corrida foi interrompida quando
188 as amostras entraram no gel de separação. Os géis foram corados com
189 Coomassie coloidal (23,24) e a banda única formada, foi recortada para a
190 digestão em gel.

191 Para digestão trípica (25) os fragmentos das bandas recortadas foram
192 descorados 3X (50% acetonitrila em 25 mmol de bicarbonato de amônia) e
193 desidratados com 100% acetonitrila por 10 minutos. A seguir, a acetonitrila foi
194 retirada e os resíduos evaporados à temperatura ambiente em capela de
195 exaustão, por 15 minutos. A redução de pontes dissulfeto foi realizada com 20
196 mmol DTT em 50 mmol de bicarbonato de amônia, a 56 °C por 40 minutos. O
197 DTT foi retirado e os fragmentos de gel novamente desidratados com 100% de
198 acetonitrila. A alquilação foi conduzida com uma solução de 55 mmol de
199 iodoacetamida em 50 mmol de bicarbonato de amônia, no escuro, à temperatura
200 ambiente, por 30 minutos.

Os fragmentos de gel foram lavados com 25 mmol de bicarbonato de amônia, seguido pela desidratação com 100% acetonitrila por 2X. Os resíduos remanescentes dos fragmentos de gel foram mantidos à temperatura ambiente, em capela de exaustão (15 a 20 minutos) para evaporação da acetonitrila. A seguir a digestão foi realizada utilizando 15 µL de uma solução de tripsina (Trypsin, Part No. V5111A, Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega Biotecnologia do Brasil LTDA) na concentração final de 20 ng/µL, numa proporção de 1:50 de enzima:substrato. As amostras foram mantidas por 15 minutos a 4 °C para que a tripsina pudesse penetrar nos fragmentos de gel e acrescidas de 50 mmol de bicarbonato de amônia. Então as amostras foram incubadas a 37 °C, por 14 horas. Os peptídeos foram eluídos após a interrupção da ação da tripsina pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila). Foram realizadas 3 eluições, sendo a primeira com 1% de ácido fórmico em 60% de metanol, por 15 minutos, a 40 °C. A segunda com 1% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila pelo mesmo tempo e temperatura. E terceira e última eluição foi conduzida com acetonitrila 100% para desidratar os fragmentos de gel. O sobrenadante de cada eluição foi agrupado e as amostras foram concentradas à vácuo (SPD1010 Integrated SpeedVac™ Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e armazenadas a -20 °C até a realização da espectrometria de massas.

As amostras foram descongeladas, diluídas em solução de ácido fórmico a 0,1% até atingir a concentração final de 0,7 µg de proteína por µL, homogeneizadas e, em seguida, submetidas à centrifugação a 1.100 × g por 5 minutos.

Para a análise por espectrometria de massas, uma alíquota de 4,5 µL foi injetada em uma coluna C18 (100 µm × 100 mm) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de ultra performance em nanoescala e fase reversa (RP-nanoUPLC) (nanoACQUITY UPLC, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). O sistema foi conectado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF) (Micromass Q-ToF PREMIER, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA), equipado com fonte de nanoeletrospray e operando com vazão de 0,600 µL/min.

O gradiente de eluição foi composto por acetonitrila (2–90%) em ácido fórmico a 0,1%, mantido por 45 minutos. Durante as análises, a voltagem da

235 fonte foi ajustada para 3,5 kV, a voltagem do cone para 30 V e a temperatura da
236 fonte mantida a 100 °C. O equipamento foi operado no modo top three, em que,
237 após a aquisição do espectro de massas (MS), os três íons mais intensos eram
238 selecionados para fragmentação (MS/MS).

239 Os parâmetros de busca incluíram a enzima tripsina, permitindo até uma
240 clivagem perdida; carbamidometilação de resíduos de cisteína como
241 modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. A
242 tolerância de massa foi definida em 1 para íons precursores (MS) quanto para
243 fragmentos (MS/MS), considerando massas moleculares monoisotópicas.

244 Os espectros foram obtidos com o software MassLynx v.4.1 (Waters
245 Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). Os arquivos brutos foram
246 convertidos para o formato .mgf (lista de picos) sem adição de scans e
247 comparados ao banco de dados UniprotSPROT (<http://www.uniprot.org/>), referente
248 à taxonomia Ovis Aries, utilizando os softwares Mascot v.2.3.02 e Mascot Distiller
249 MDRO v.2.4.0.0 (Matrix Science Inc., Boston, MA, EUA).

250 Os dados proteômicos obtidos por espectrometria de massas foram
251 depositados na plataforma Mendeley Data. A quantificação relativa das proteínas
252 identificadas foi realizada por meio do cálculo do índice de abundância proteica
253 exponencialmente modificado (emPAI), utilizando o software Mascot Distiller.

254

255 2.6. Análise estatística dos dados

256 A normalização dos dados foi realizada considerando as proteínas
257 presentes em pelo menos 50% + 1 das amostras de cada grupo (proteínas
258 presentes em pelo menos 3 dos 5 animais do grupo). Para minimizar os efeitos
259 de valores atípicos (outliers), o valor de emPAI de cada amostra foi dividido pela
260 soma dos valores de emPAI de todas as amostras dentro de cada grupo. O valor
261 resultante foi utilizado para as análises estatísticas.

262 Os dados foram transformados, de acordo com a necessidade, no
263 software MetaboAnalyst 6.0. para reduzir assimetria, variância não constante ou
264 diferenças de magnitude entre variáveis. Cada comparação entre control e
265 tratamento foi submetido ao tipo de transformação, que melhor se encaixasse,
266 sendo control x 24h a transformação de log *transformation* (base 10), control x
267 48h e control x 7d sem transformação, enquanto control x 14d transformação da
268 raiz quadrada (raiz quadrada dos valores dos dados). Além disso, após a

269 transformação foi realizado o escalonamento dos dados para que todas as
270 variáveis tivessem importância comparável, todos em Pareto *scaling*.

271 A análise estatística foi conduzida também no software MetaboAnalyst
272 6.0. Foi empregado o teste t de Student para comparar individualmente os
273 grupos tratamento (24 h, 48 h, 7 dias e 14 dias) com o grupo control,
274 considerando significativas as diferenças com $FDR < 0,05$. Para a análise
275 multivariada, empregaram-se a análise de componentes principais (PCA), a fim
276 de explorar o padrão global de agrupamento

277 Foram consideradas como proteínas diferencialmente abundantes (PDA)
278 as que apresentaram $\log_2$ (*fold change*) (Log_2FC) $> 1,5$ e *false discovery rate*
279 (FDR) $< 0,05$, tendo sido classificadas como *upregulated* ou *downregulated* de
280 acordo com a direcionalidade da variação.

281 Para representação gráfica dos resultados utilizou-se mapas de calor
282 (para as 10 proteínas com maior variação de abundância), e *volcano plots*, todos
283 gerados no MetaboAnalyst 6.0, com o objetivo de evidenciar padrões de
284 expressão e distinguir os perfis proteicos entre os grupos experimentais.

285 Para a análise de interseção entre os conjuntos de proteínas identificadas
286 nos diferentes grupos, foi utilizado o *Venn Diagram*
287 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), que permitiu identificar
288 proteínas exclusivas e comuns entre os grupos experimentais.

289 Adicionalmente, as proteínas encontradas nos grupos (24h, 48h, 7d e
290 14d) foram analisadas usando o ShinyGO V0.85 (South Dakota State University,
291 <https://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) para análise de enriquecimento funcional
292 (*fold enrichment*). Os resultados obtidos foram posteriormente integrados e
293 visualizados em gráficos do tipo Sankey e *dot plots*, gerados no site *SR Plot*
294 (<https://www.bioinformatics.com.cn/srplot>), a fim de ilustrar as principais vias
295 biológicas enriquecidas e suas inter-relações.

296

297 3. RESULTADOS

298 Em ambas as durações da insulação escrotal (24 ou 48h) a temperatura
299 da superfície escrotal com aumentou $\sim 5^\circ\text{C}$. Enquanto a temperatura retal
300 permaneceu inalterada.

301

302

3.1. Control versus 24h

Foram encontradas 250 proteínas considerando os grupos control e 24h; e 127 proteínas foram comuns aos grupos (Figura 2). A análise de componentes principais (PCA) demonstrou que não houve separação clara entre os grupos, indicando sobreposição parcial dos perfis de proteínas, sendo que a somatória do PC1 e PC2 foi 57,1%, (Figura 3).

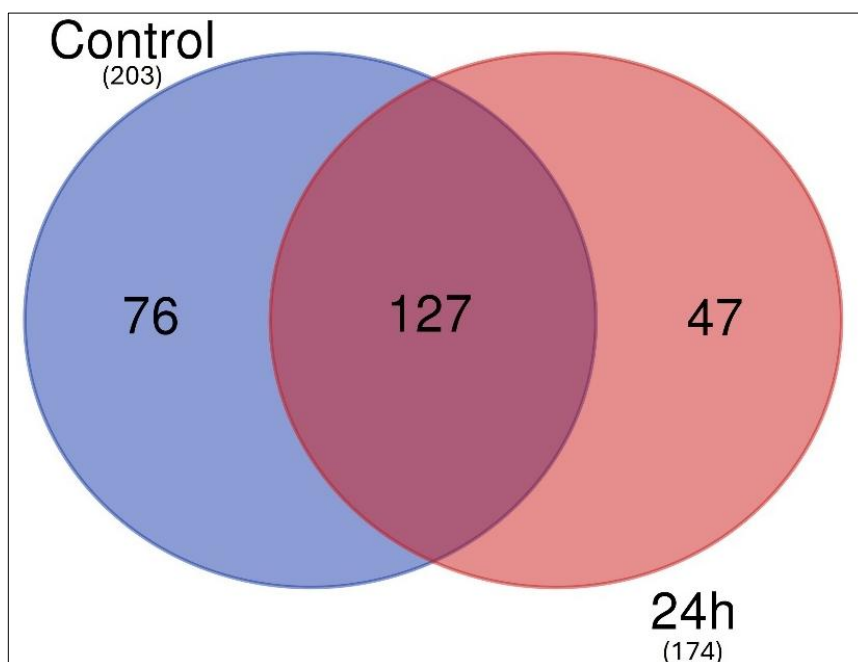


Figura 2. Diagrama de Venn dos grupos control e 24h.

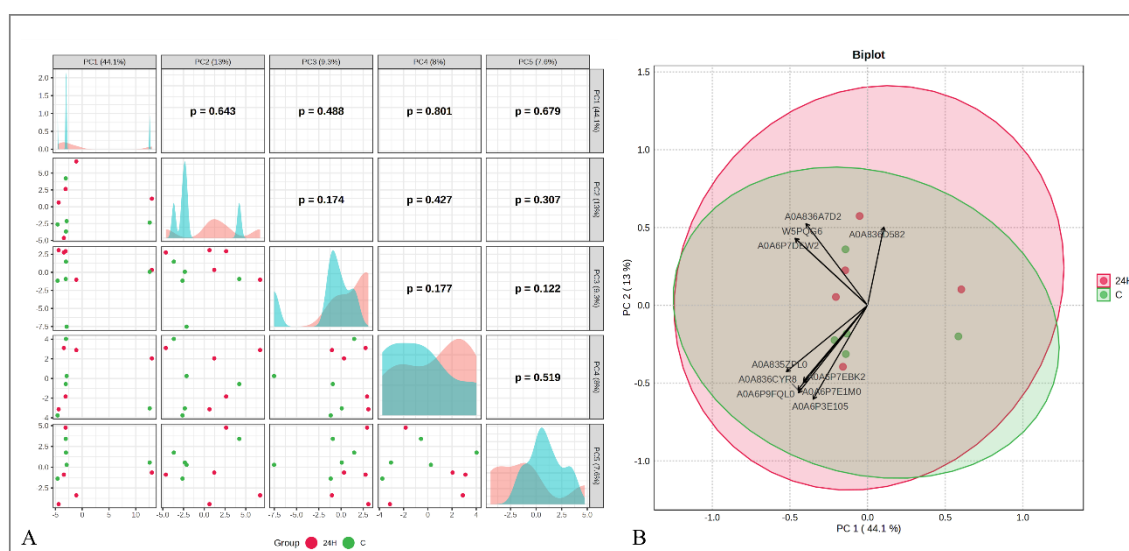
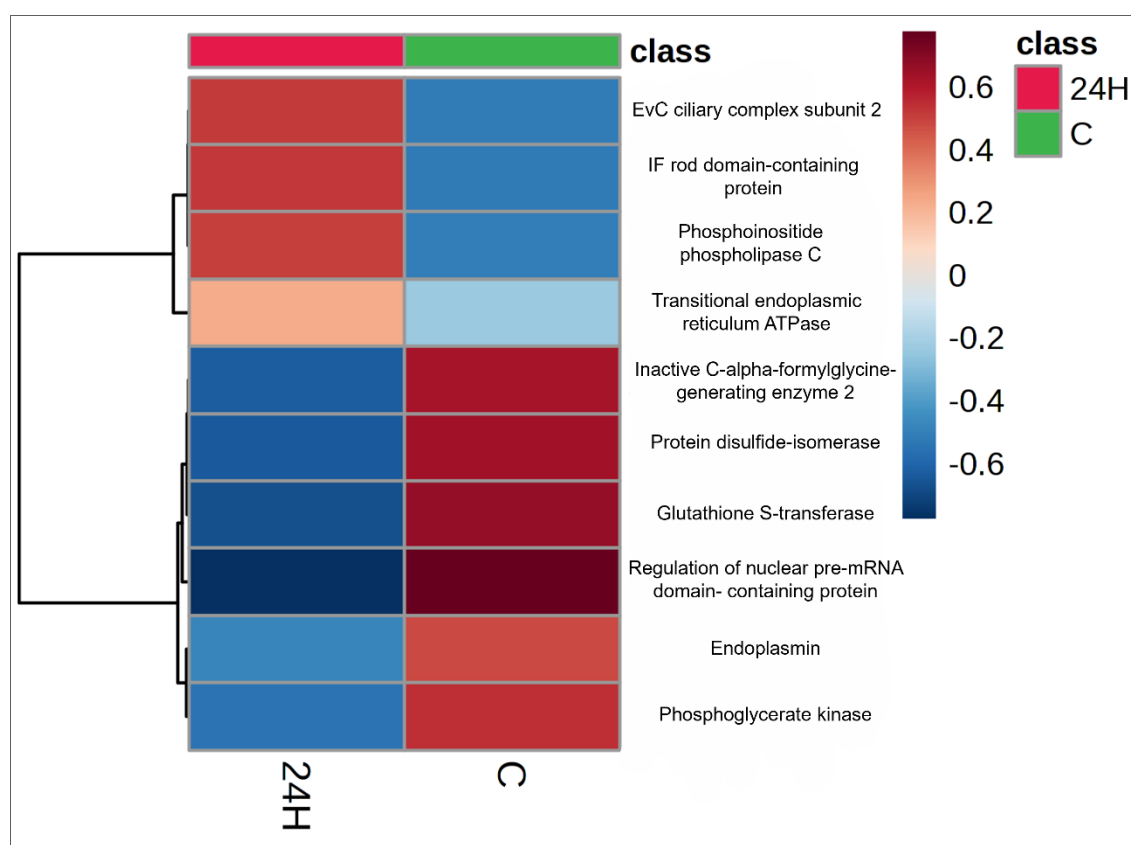


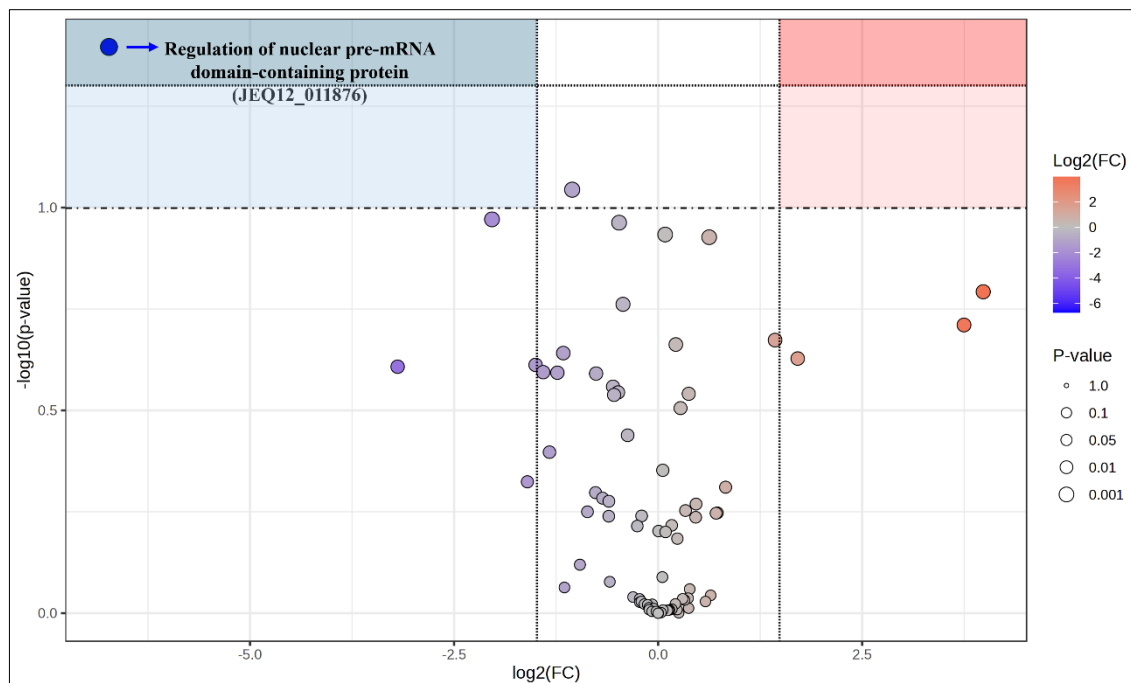
Figura 3. Resultado da análise de componente principal para os grupos control e 24h. A. PCA pair. B. PCA score biplot. PC1 + PC2 = 57,1%.

315 A análise hierárquica representada no mapa de calor entre os grupos
 316 control e 24h após a insulação escrotal (Figura 4). As proteínas *EvC ciliary*
 317 *complex subunit 2*, *IF rod domain-containing protein*, *Phosphoinositide*
 318 *phospholipase C* e *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* mostraram maior
 319 abundância no grupo 24h, enquanto *Inactive C-alpha-formylglycine-generating*
 320 *enzyme 2*, *Protein disulfide-isomerase*, *Glutathione S-transferase*, *Regulation of*
 321 *nuclear pre-mRNA domain-containing protein*, *Endoplasmin* e *Phosphoglycerate*
 322 *kinase* apresentaram redução relativa de abundância em relação ao grupo
 323 controle. Esses resultados indicam que, após 24h de exposição ao calor, há
 324 modificação no padrão de expressão proteica testicular, com a ocorrência de
 325 proteínas tanto *upregulated* quanto *downregulated* em comparação ao grupo
 326 control.
 327



328
 329 **Figura 4.** Mapa de calor das 10 proteínas testiculares com maior variação de
 330 abundância entre os grupos control e 24h (24h de insulação testicular) em
 331 ovinos. A escala de cores representa a abundância relativa das proteínas:
 332 vermelho indica maior abundância e azul, menor abundância. Os dados foram
 333 normalizados e agrupados por similaridade de perfil de abundância.

334 No *Volcano plot* (Figura 5) foi identificada apenas 1 PDA (Log2FC >1,5, e
 335 FDR < 0,05) no grupo 24 h, sendo esta *downregulated* (regulation of nuclear pre-
 336 mRNA domain-containing protein - JEQ12_011876).
 337



338
 339 **Figura 5.** *Volcano plot* dos grupos **control versus 24h**. A proteína destacada
 340 em azul foi *downregulated* no grupo 24h.

341 342 **3.2. Control versus 48h.**

343 Foram encontradas 243 proteínas considerando os grupos control e 48h.
 344 Destas, 124 foram comuns aos dois grupos (Figura 6). A PCA demonstrou que
 345 não houve separação clara entre os grupos, indicando sobreposição parcial dos
 346 perfis proteômicos, sendo que a somatória do PC1 e PC2 foi 53,2%, (Figura 7).

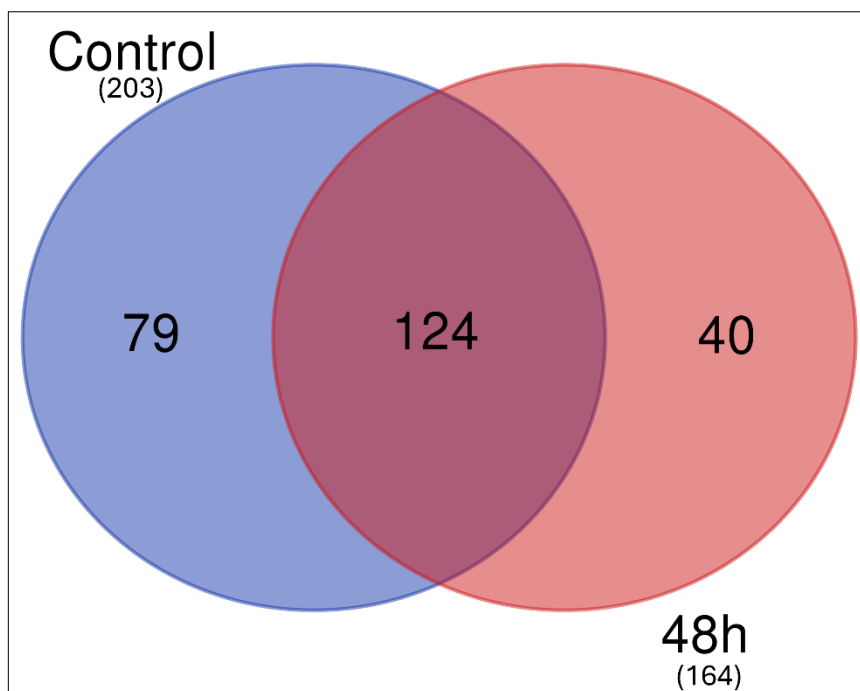


Figura 6. Diagrama de Venn dos grupos control e 48h.

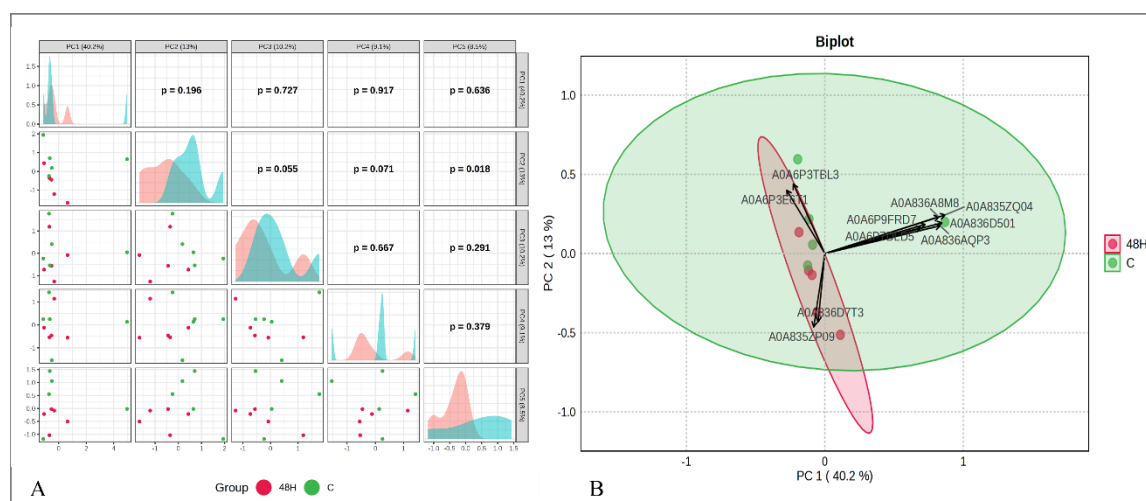
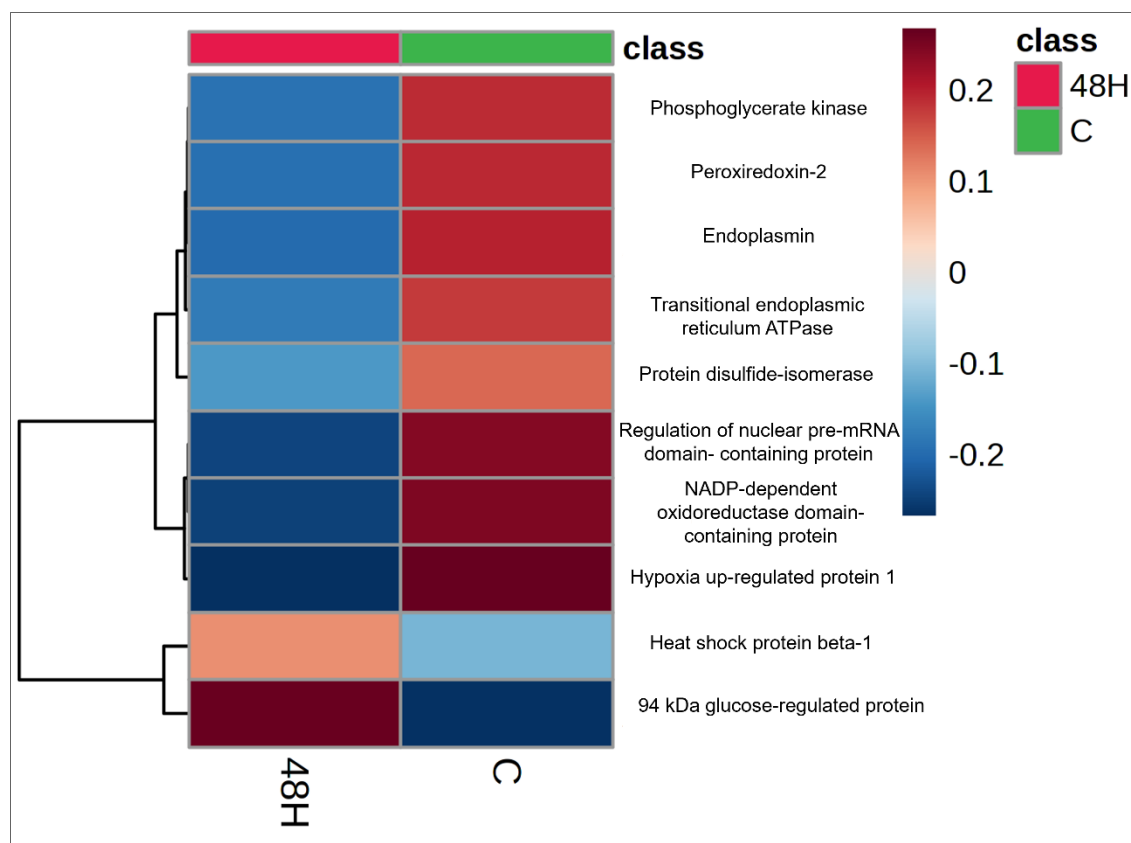


Figura 7. Resultado da análise de componente principal para os grupos control e 48h. A. PCA pair. B. PCA score biplot. PC1 + PC2 = 53,2%.

A análise hierárquica representada no mapa de calor entre os grupos control e 48h após a insulação escrotal (Figura 8). As proteínas *Heat shock protein beta-1* e *94 kDa glucose-regulated protein* mostraram maior expressão no grupo 48h, enquanto *Phosphoglycerate kinase*, *Peroxiredoxin-2*, *Endoplasmic reticulum ATPase*, *Protein disulfide-isomerase*, *Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein*, *NADP-*

360 *dependent oxidoreductase domain-containing protein* (A0A836AB96) e *Hypoxia*
 361 *up-regulated protein 1* apresentaram redução relativa de abundância em relação
 362 ao grupo control. Esses resultados indicam que, após 48h de exposição ao calor,
 363 há modificação no padrão de expressão proteica testicular, com a ocorrência de
 364 proteínas tanto *upregulated* quanto *downregulated* em comparação ao grupo
 365 controle.
 366



367
 368 **Figura 8.** Mapa de calor das 10 proteínas testiculares com maior variação de
 369 abundância entre os grupos control e 48h (48h de insulação testicular) em
 370 ovinos. A escala de cores representa a abundância relativa das proteínas:
 371 vermelho indica maior abundância e azul, menor abundância. Os dados foram
 372 normalizados e agrupados por similaridade de perfil de abundância.

373
 374 No *Volcano plot* (Figura 9) foi identificada apenas 4 PADs ($\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$,
 375 e $\text{FDR} < 0,05$) entre os grupos, sendo 3 destas *downregulated* (Hypoxia up-
 376 regulated protein 1 [HYOU1]; Endoplasmic reticulum ATPase [JEQ12_014739]; NADP-dependent
 377 oxidoreductase domain-containing protein [JEQ12_009635]) e 1 *upregulated* (94
 378 kDa glucose-regulated protein [JEQ12_007615]). Outras proteínas foram

identificadas com abundância diferenciada ($\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$, porém com FDR entre 0,1 e 0,05), sendo estas 3 proteínas *downregulated* (Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein [JEQ12_011876]; Peroxiredoxin-2 [JEQ12_016260]; Transitional endoplasmic reticulum ATPase [JEQ12_009071]).

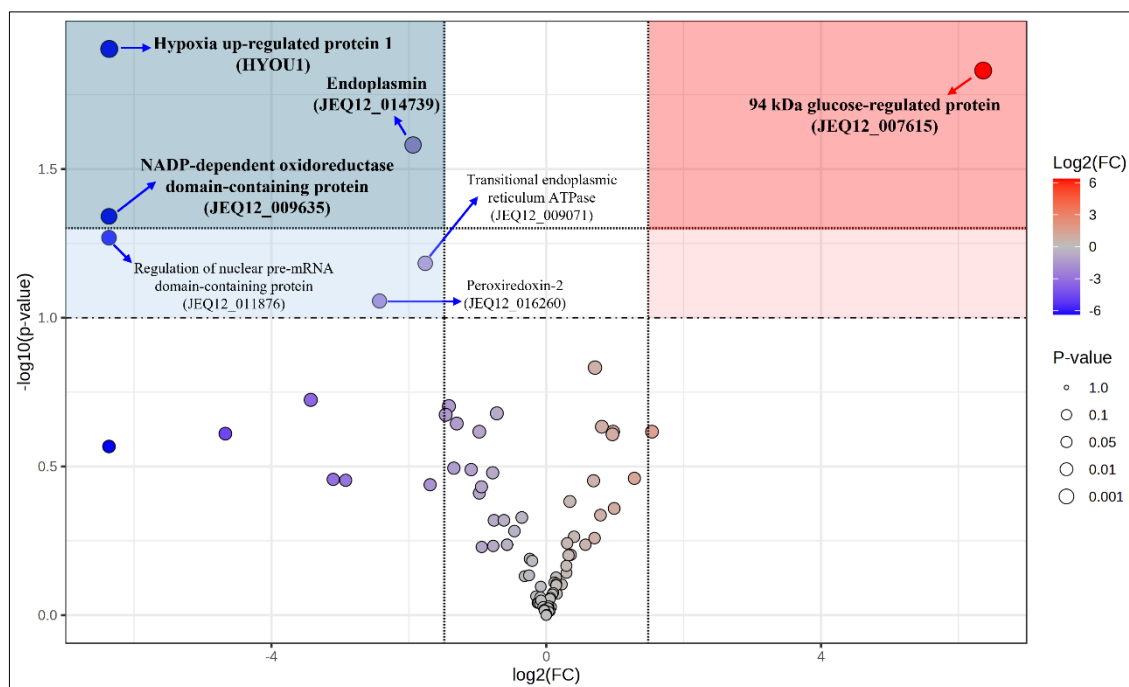


Figura 9. Volcano plot dos grupos control versus 48h. Proteínas destacadas em azul foram *downregulated* e em vermelho *upregulated* no grupo 48h.

3.3. Control versus 7d

Foram encontradas 271 proteínas considerando os grupos control e 48h; e 139 proteínas foram comuns aos grupos (Figura 10). A PCA entre os grupos demonstrou as 9 proteínas que mais contribuíram para separação dos grupos, sendo que a somatória do PC1 e PC2 foi 48,3% (Figura 11), contudo ainda houve uma grande sobreposição entre os grupos.

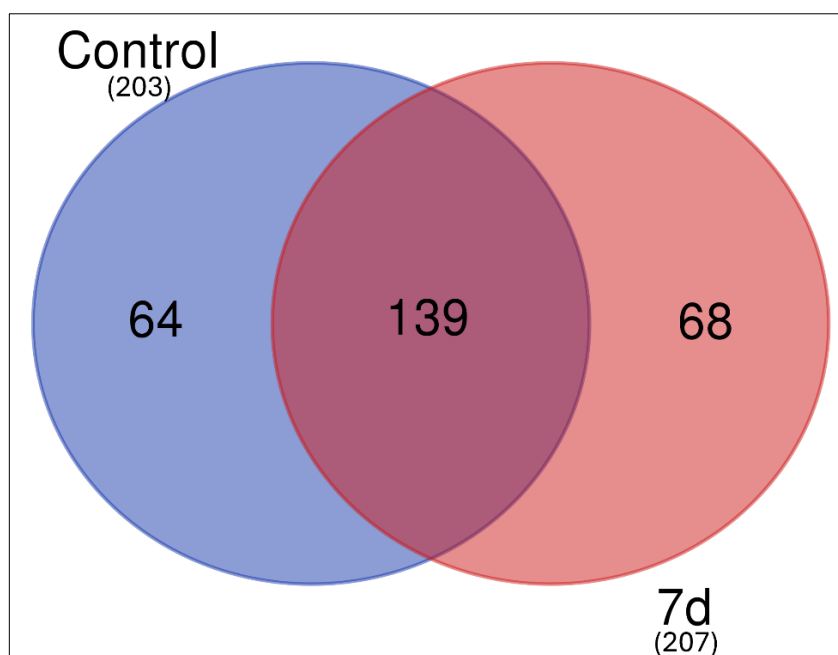


Figura 10. Diagrama de Venn dos grupos **control** e **7d**.

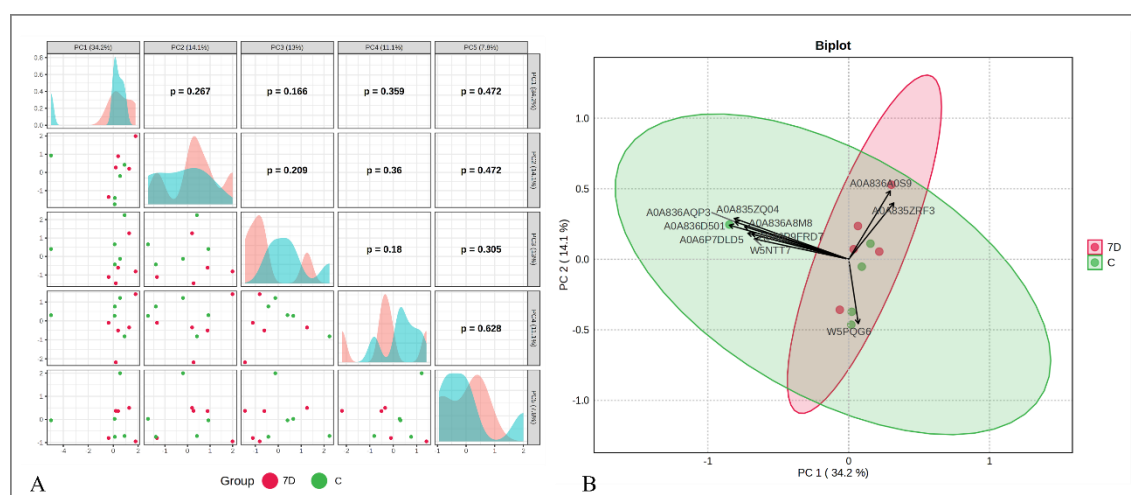


Figura 11. Resultado da análise de componente principal para os grupos **control** e **7d**. **A.** PCA pair. **B.** PCA score biplot. PC1 + PC2 = 48,3%.

A análise hierárquica representada no mapa de calor entre os grupos control e 7d após a insulação escrotal (Figura 12). As proteínas *Histone H3*, *Inositol-3-phosphate synthase 1*, *Glutathione S-transferase*, *L-amino-acid oxidase*, *Galectin*, *ATP synthase subunit beta*, *Uncharacterized protein* e *Histone H4* mostraram maior abundância o grupo 7d, enquanto *Inositol-3-phosphate synthase 1* e *Protein disulfide-isomerase* apresentaram redução relativa de abundância em relação ao grupo controle. Esses resultados indicam que, após

7d de exposição ao calor, há modificação no padrão de expressão proteica testicular, com a ocorrência de proteínas tanto *upregulated* quanto *downregulated* em comparação ao grupo control.

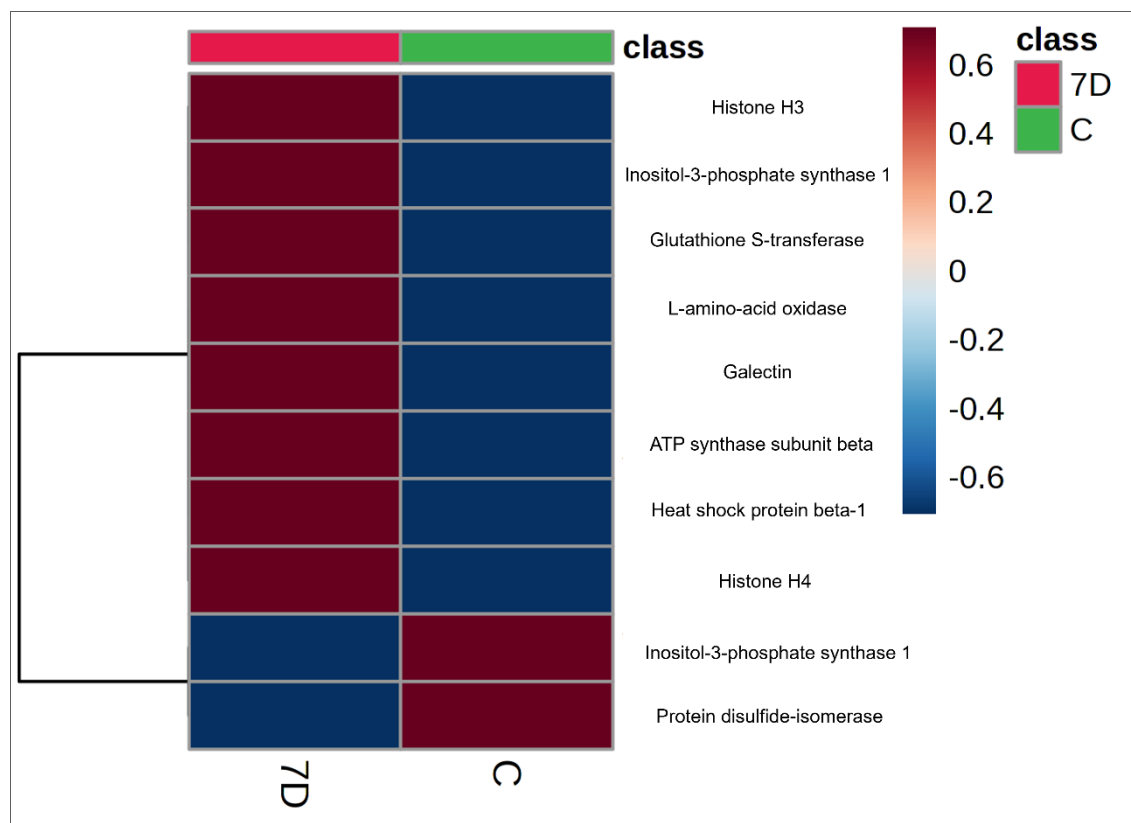


Figura 12. Mapa de calor das 10 proteínas testiculares com maior variação de abundância entre os grupos control e 7d após o início da insulação testicular em ovinos. O estímulo térmico durou 48 h, e as amostras foram coletadas no sétimo dia. A escala de cores indica a abundância relativa: vermelho para maior e azul para menor. Os dados foram normalizados e agrupados por perfil de abundância.

No Volcano plot (Figura 13) foi identificada apenas 3 proteínas com abundância diferenciada significativa ($\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$, e $\text{FDR} < 0,05$) entre os grupos, sendo 2 destas *downregulated* (Protein disulfide-isomerase [JEQ12_002549]; Inositol-3-phosphate synthase 1 [ISYNA1]) e 1 *upregulated* (Inositol-3-phosphate synthase 1 [JEQ12_016061]). Outras proteínas foram identificadas com abundância aumentada pelo critério de $\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$, porém com valor de FDR entre 0,1 e 0,0, sendo estas Galectin [JEQ12_015116], Histone H3 [JEQ12_002451], e L-amino-acid oxidase [JEQ12_005573].

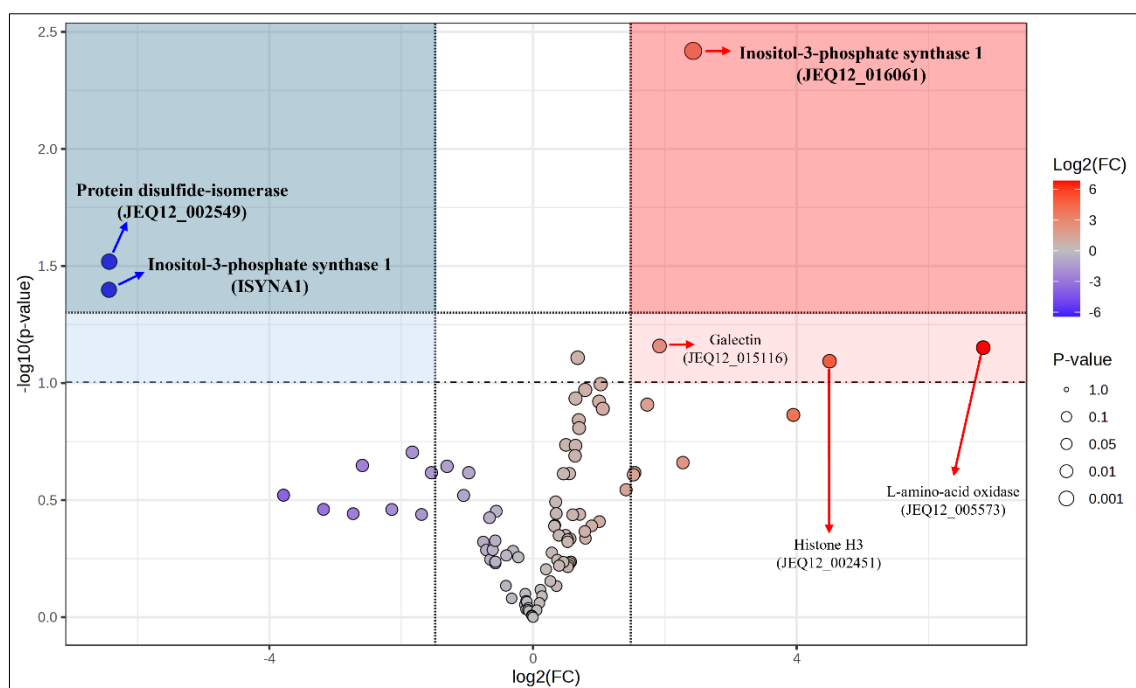


Figura 13. Volcano plot dos grupos **control versus 7d**. Proteínas destacadas em azul foram *downregulated* e em vermelho *upregulated* no grupo 7d.

3.4. Control versus 14d

Foram encontradas 246 proteínas considerando os grupos control e 48h; e 128 proteínas foram comuns aos grupos (Figura 14). A análise de componentes principais (PCA) entre os grupos demonstrou as 10 proteínas que mais contribuíram para a separação, sendo que a somatória do PC1 e PC2 foi de 50,3% (Figura 15). A PCA evidenciou uma separação mais pronunciada entre os grupos em relação aos períodos anteriores, embora ainda houvesse discreta sobreposição.

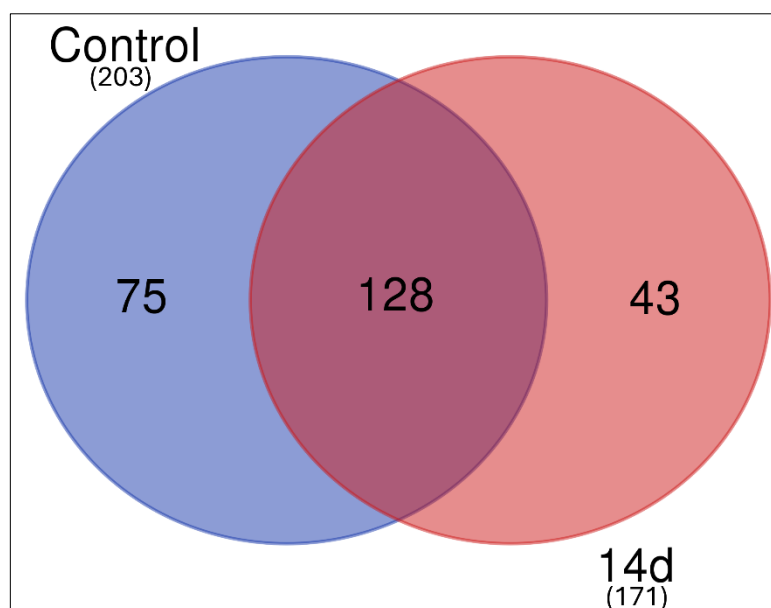


Figura 14. Diagrama de Venn dos grupos **control** e **14d**.

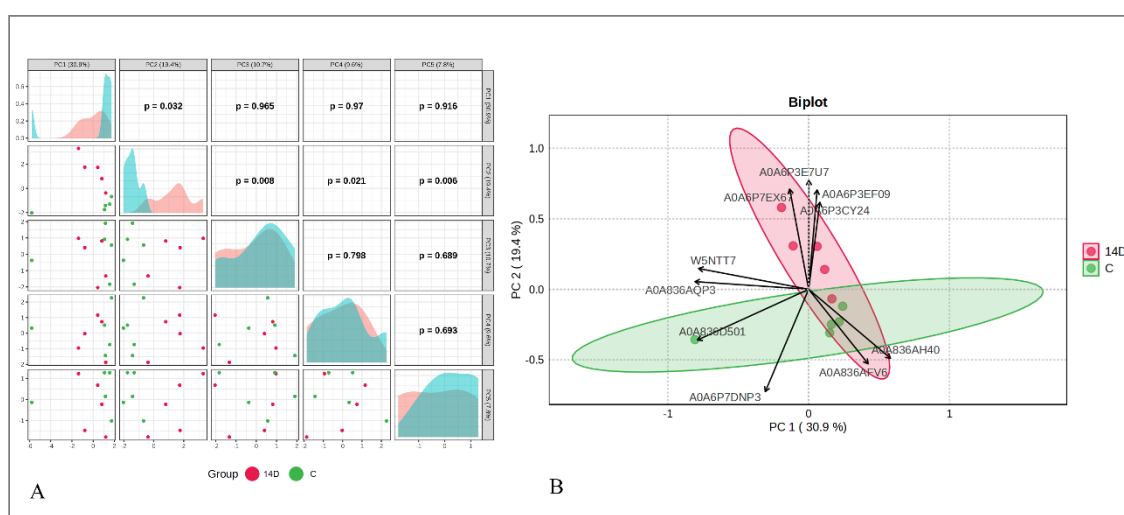


Figura 15. Resultado da análise de componente principal para os grupos **control** e **14d**. **A.** PCA *pair*. **B.** PCA *score biplot*.. PC1 + PC2 = 50,3%

A análise hierárquica representada no mapa de calor entre os grupos control e 14d após a insulação escrotal (Figura 16). As proteínas *Inositol-3-phosphate synthase*, *Mimecan*, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*, *L-amino-acid oxidase*, *Heat shock protein beta-1*, *Glutathione transferase* e *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* mostraram maior abundância no grupo 14d, enquanto *Inactive C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2*, *Inositol-3-phosphate synthase 1* e *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* apresentaram redução relativa de abundância em relação ao grupo controle.

Esses resultados indicam que, após 14d de exposição ao calor, há modificação no padrão de expressão proteica testicular, com a ocorrência de proteínas tanto *upregulated* quanto *downregulated* em comparação ao grupo controle.

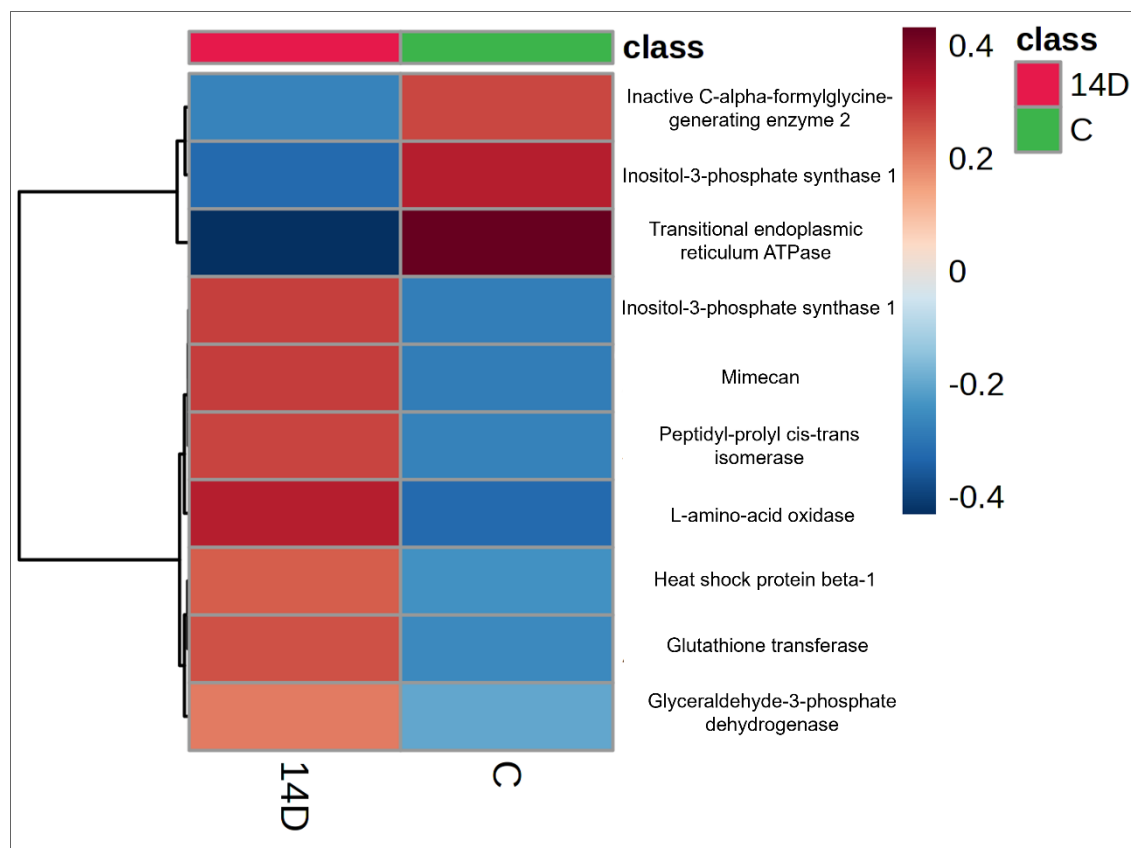


Figura 16. Mapa de calor das 10 proteínas testiculares com maior variação de abundância entre os grupos control e 14d após o início da insulação testicular em ovinos. O estímulo térmico durou 48 h, e as amostras foram coletadas no 14º dia. A escala de cores indica a abundância relativa: vermelho para maior abundância e azul para menor abundância. Os dados foram normalizados e agrupados por perfil de abundância.

No *Volcano plot* (figura 17) foram identificadas 4 proteínas com abundância diferenciada significativa ($\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$, e $\text{FDR} < 0,05$) entre os grupos, sendo 2 destas *downregulated* (Transitional endoplasmic reticulum ATPase [JEQ12_009071]; Inositol-3-phosphate synthase 1 [SYNA1]) e 2 *upregulated* (Glutathione transferase [JEQ12_000643]; (L-amino-acid oxidase [JEQ12_005573])). Outras proteínas foram identificadas com abundância aumentada pelo critério de $\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$, porém com valor de FDR entre 0,1 e

0,0, sendo estas 2 proteínas *downregulated* (Inactive C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2 [JEQ12_012566]; Protein disulfide-isomerase [JEQ12_002549]) e 6 *upregulated* (Heat shock protein beta-1 [JEQ12_012626]; Mimecan [JEQ12_008841]; Inositol-3-phosphate synthase 1 [JEQ12_016061]; Peptidyl-prolyl cis-trans [JEQ12_018182]; Tubulin alpha chain [JEQ12_014416]; Gastrin-releasing peptide [JEQ12_012070]).

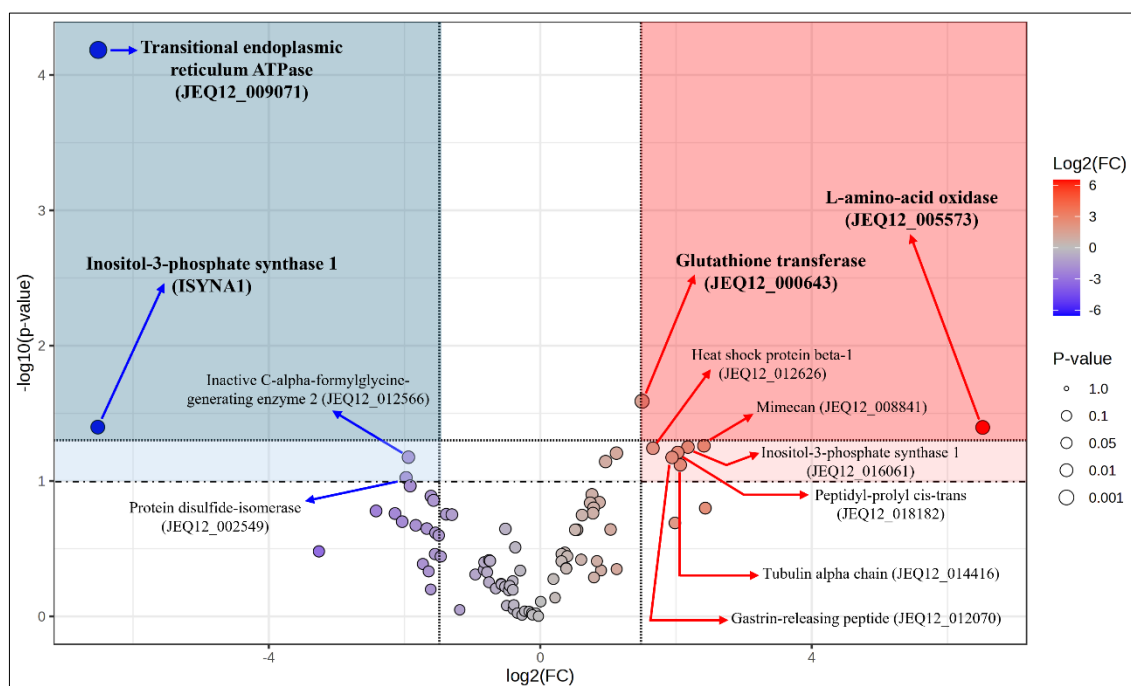


Figura 17. Volcano plot dos grupos **control versus 14d**. Proteínas destacadas em azul foram *downregulated* e em vermelho *upregulated* no grupo 14d.

3.5. Ontologia gênica

3.5.1. Grupo 24h

A análise de enriquecimento de processos biológicos do grupo 24h revelou envolvimento significativo de proteínas diferencialmente expressas em vias relacionadas à resposta ao estresse oxidativo, ao metabolismo de nucleotídeos e aos mecanismos de resposta inflamatória. As principais proteínas associadas foram ST13, PGK1 e PRDX2, cada uma conectada a múltiplos termos funcionais (Figura 18A).

A análise de enriquecimento por função molecular revelou no grupo 24h, as proteínas diferencialmente abundantes apresentaram associação significativa a termos relacionados principalmente à atividade oxirredutase (Figura 18B).

Entre as proteínas identificadas, destacaram-se RPRD1A, PRDX2 e PGK1, que se conectaram a múltiplos termos funcionais.

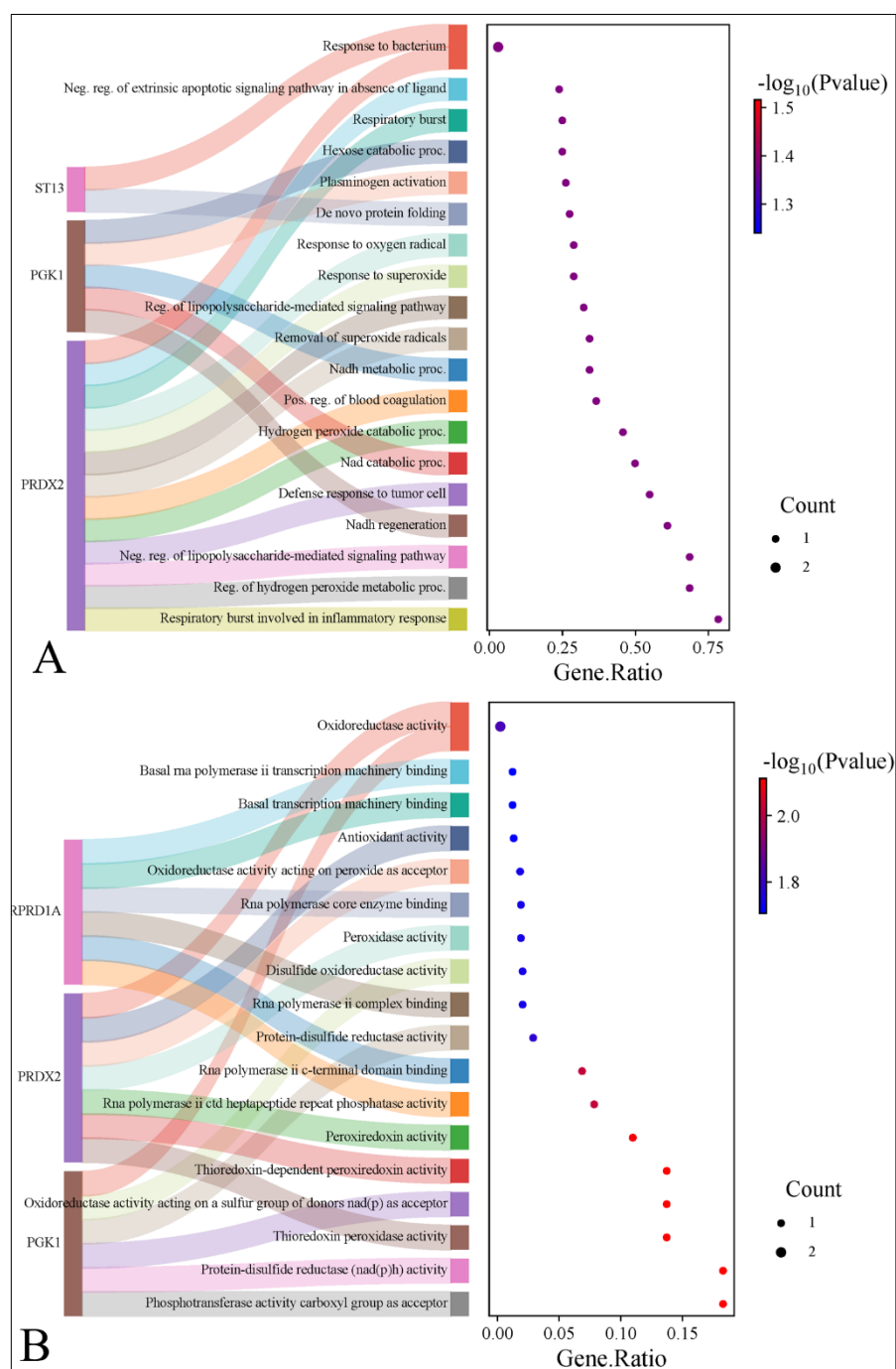
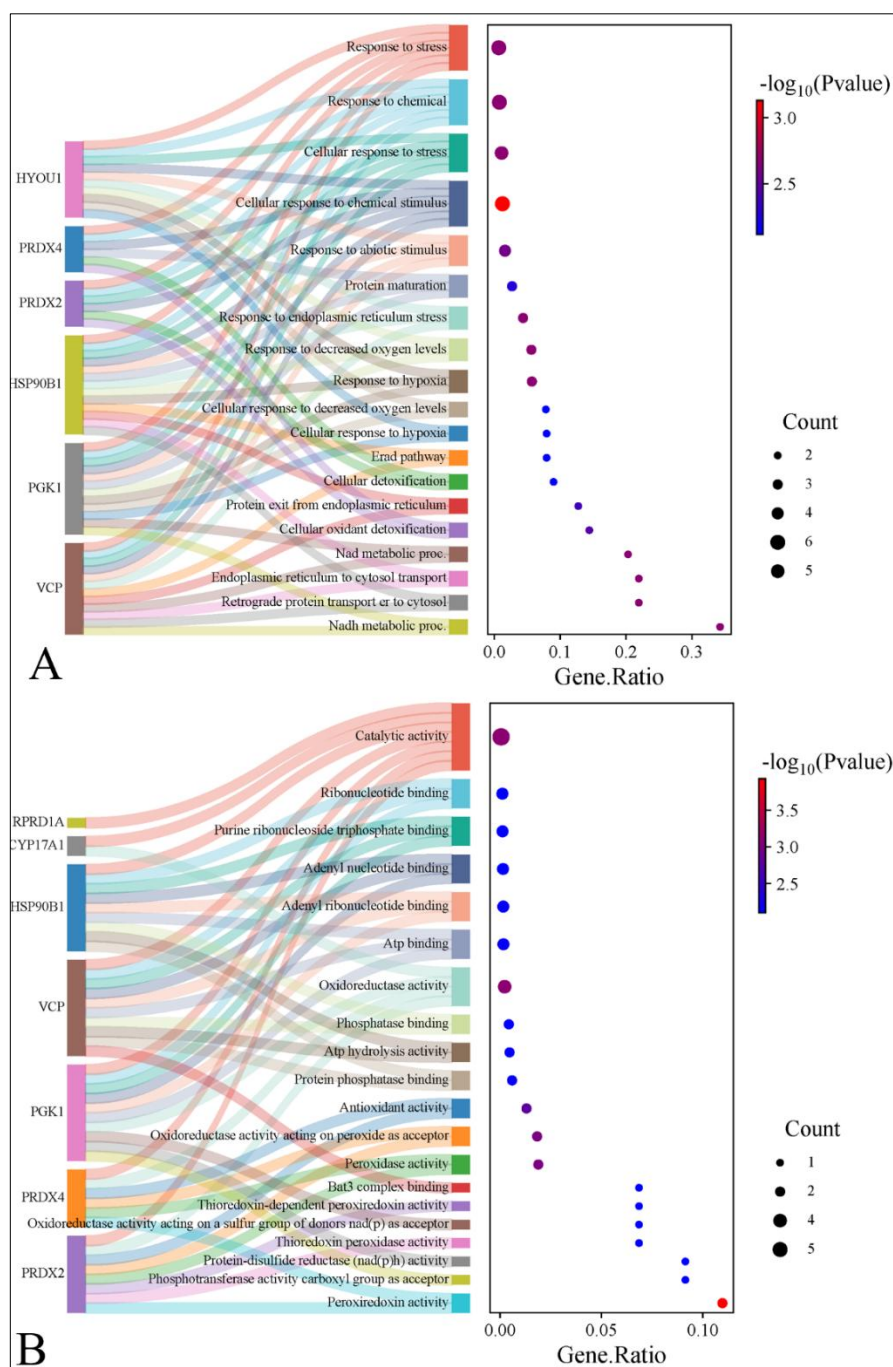


Figura 18. A. Enriquecimento das vidas do processo biológico (ShinyGO 0.82) do **grupo 24 horas**. **B.** Enriquecimento das vias da função molecular (ShinyGO 0.82) do **grupo 24 horas**. Figura construída (gráfico Sankey) no SRPLOT (<https://www.bioinformatics.com.cn/>).

503 **3.5.2. Grupo 48h**

504 No enriquecimento em processos biológicos do grupo 48h amplamente
505 relacionados à resposta ao estresse, homeostase oxidativa e metabolismo
506 energético (Figura 19A). Entre as proteínas diferencialmente expressas,
507 destacaram-se HYOU1, PRDX4, PRDX2, HSP90B1, PGK1 e VCP, as quais
508 estiveram associadas a múltiplos termos funcionais.

509 A análise de enriquecimento de função molecular do grupo 48h revelou
510 participação de um número maior de proteínas diferencialmente expressas em
511 relação ao observado em 24h, com destaque para RPRD1A, CYP17A1,
512 HSP90B1, VCP, PGK1, PRDX4 e PRDX2 (Figura 19B). Essas proteínas foram
513 associadas a múltiplos termos funcionais de alta significância estatística.



514

515 **Figura 19. A.** Enriquecimento das vidas do processo biológico (ShinyGO 0.82)
 516 do **grupo 48 horas**. **B.** Enriquecimento das vias da função molecular (ShinyGO
 517 0.82) do **grupo 48 horas**. Figura construída (gráfico Sankey) no SRPLOT
 518 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>).

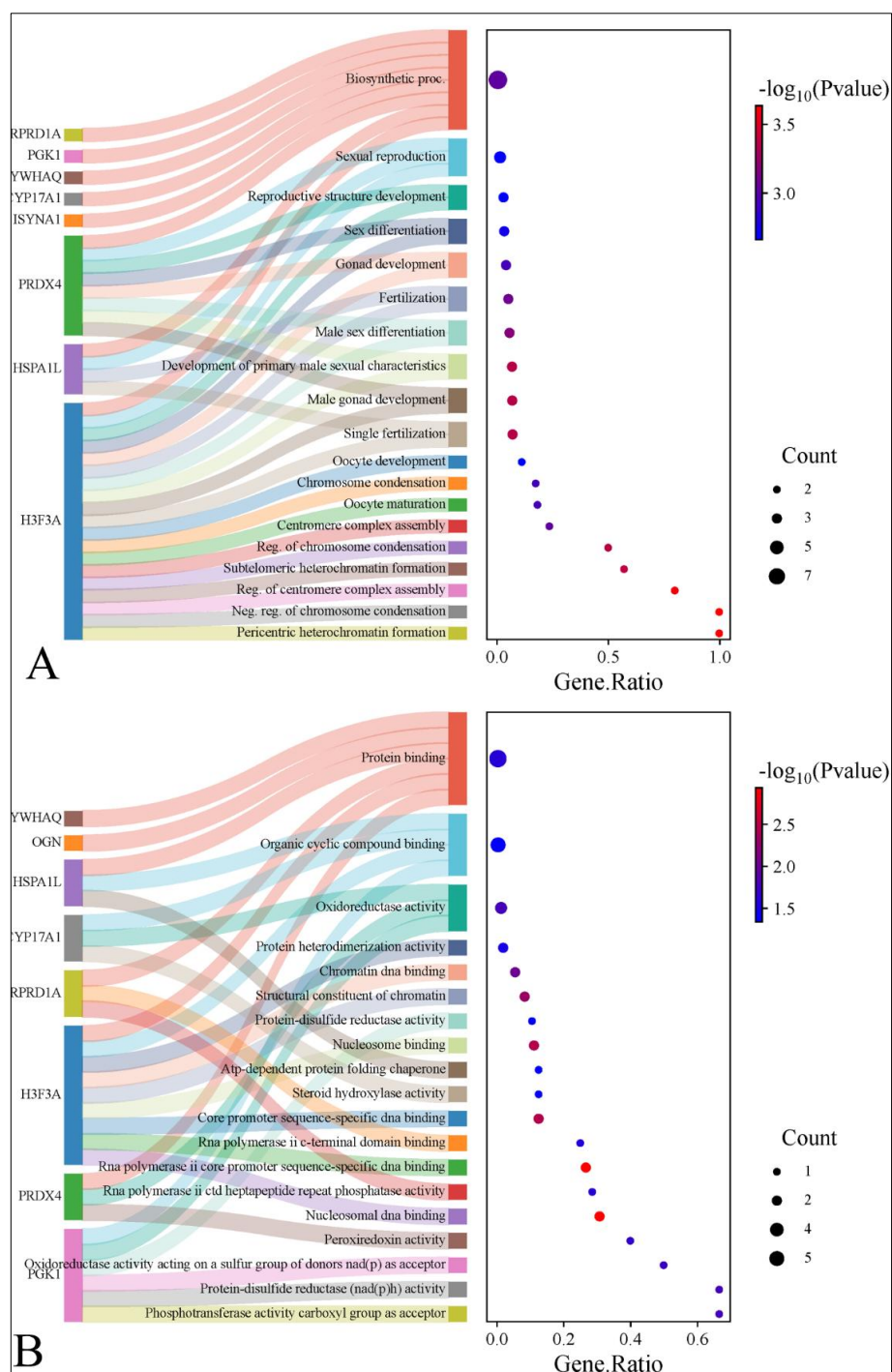
519

520 3.5.3. Grupo 7d

521 A análise de enriquecimento de processo biológico do grupo 7d
 522 evidenciou a participação de proteínas diferencialmente expressas, incluindo
 523 YWHAQ, HSPA1L, CYP17A1, RPRD1A, H3F3A, PRDX4, ISYNA1 e PGK1

524 (Figura 20A). Essas proteínas foram mapeadas em múltiplos termos biológicos
525 relevantes, com significância estatística elevada, refletindo a persistência de
526 alterações em processos fundamentais para a homeostase testicular mesmo
527 após uma semana do estresse térmico.

528 A análise de enriquecimento de função molecular do grupo 7d revelou a
529 participação de um conjunto diversificado de proteínas diferencialmente
530 expressas, incluindo YWHAQ, HSPA1L, CYP17A1, RPRD1A, H3F3A, PRDX4 e
531 PGK1 (Figura 20B). Essas proteínas foram associadas a múltiplos termos
532 funcionais relevantes, com significância estatística elevada, refletindo processos
533 moleculares ainda ativos na fase tardia da resposta ao estresse térmico.



534

535 **Figura 20. A.** Enriquecimento das vidas do processo biológico (ShinyGO 0.82)
 536 do **grupo 7 dias**. **B.** Enriquecimento das vias da função molecular (ShinyGO
 537 0.82) do **grupo 7 dias**. Figura construída (gráfico Sankey) no SRPLOT
 538 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>).

539

540

541

542 **3.5.4. Grupo 14d**

543 A análise de enriquecimento de processo biológico do grupo 14d
544 evidenciou a participação de um conjunto diversificado de proteínas
545 diferencialmente expressas, incluindo LZTFL1, HSPB1, OGN, PRDX4, GSTM4,
546 CYP17A1, ISYNA1, PGK1, H2BC1, VCP, RAN, PPIB, RPRD1A, TUBA8 e
547 TUBA1B (Figura 21A). Esses achados revelam que, mesmo após duas semanas
548 do estresse térmico, persistem alterações em vias associadas ao metabolismo,
549 à regulação celular e à organização estrutural, refletindo a manutenção de uma
550 resposta prolongada no tecido testicular.

551 A análise de enriquecimento de função molecular do grupo 14d identificou
552 um conjunto amplo de proteínas diferencialmente expressas, incluindo LZTFL1,
553 HSPB1, OGN, PRDX4, GSTM4, CYP17A1, ISYNA1, PGK1, H2BC1, VCP, RAN,
554 PPIB, RPRD1A, TUBA8 e TUBA1B (Figura 21B). Esses achados demonstram
555 que, mesmo após duas semanas do estresse térmico, persistem alterações
556 relevantes em funções catalíticas, de ligação a nucleotídeos e de organização
557 estrutural celular.

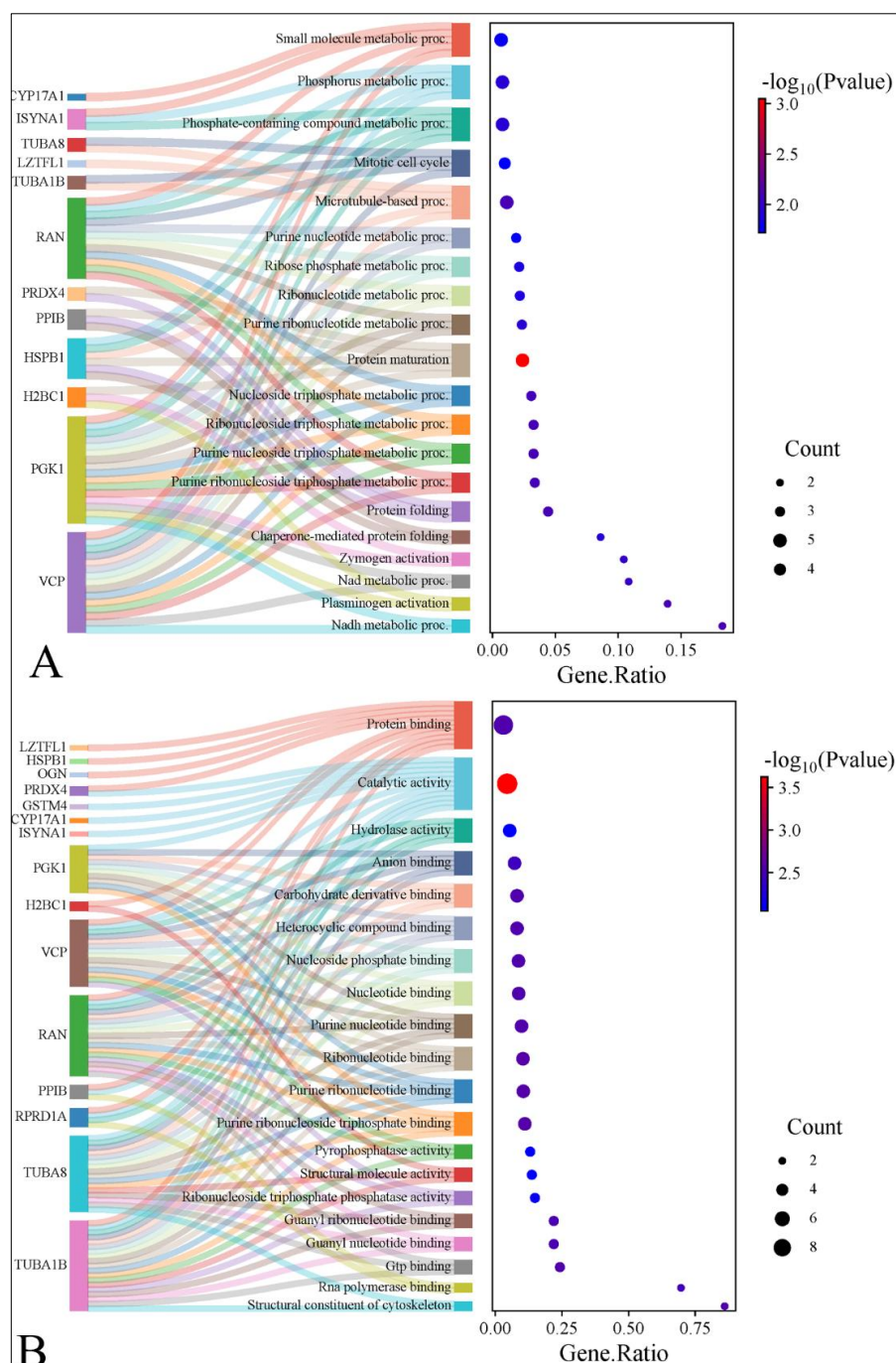


Figura 21. A. Enriquecimento das vidas do processo biológico (ShinyGO 0.82) do grupo 14 dias. **B.** Enriquecimento das vias da função molecular (ShinyGO 0.82) do grupo 14 dias. Figura construída (gráfico Sankey) no SRPLOT (<https://www.bioinformatics.com.cn/>).

4. DISCUSSÃO

O estresse térmico ocorre quando os mecanismos fisiológicos de termorregulação são intensamente ativados para manter a homeotermia pela

567 troca eficiente de calor entre o organismo e o ambiente (26,27). Quando esses
568 mecanismos se tornam insuficientes e há elevação da temperatura corporal,
569 configura-se uma falha alostática. Nos machos, para que a espermatogênese
570 ocorra de forma adequada, os testículos devem permanecer de 3 a 5 °C abaixo
571 da temperatura corporal central (10). Quando a homeostase testicular é
572 comprometida e esse gradiente térmico é alterado, o aquecimento testicular
573 resultante desencadeia uma série de respostas moleculares que impactam
574 diretamente a função reprodutiva (15). O estresse térmico é o tipo de estresse
575 mais estudado em animais, devido aos inúmeros prejuízos econômicos que
576 acarreta, prejuízos esses que vêm se intensificando com o aumento progressivo
577 da temperatura média global nas últimas décadas.

578 Diante desse contexto, nosso estudo foi conduzido com o objetivo de
579 compreender as alterações no perfil proteico testicular de carneiros submetidos
580 à insulação escrotal aguda (24 ou 48 h). Assim, este trabalho contribui para a
581 compreensão das respostas adaptativas e disfuncionais desencadeadas pelo
582 estresse térmico agudo em ovinos, ampliando o conhecimento sobre os
583 impactos da hipertermia na fertilidade masculina e suas possíveis implicações
584 para a reprodução animal.

585 Nos ovinos, a atividade reprodutiva apresenta variação sazonal, com
586 redução da espermatogênese e da concentração de testosterona durante o
587 verão (4,5,19). Uma das raças deslanada utilizadas neste estudo, Santa Inês é
588 pouco influenciadas pela sazonalidade (28). Ainda assim, o experimento foi
589 conduzido entre o final do outono e o início do inverno, visando minimizar
590 interferências sazonais sobre a função reprodutiva. Desta maneira, as alterações
591 observadas refletem predominantemente a resposta testicular ao aquecimento
592 escrotal agudo induzido pela insulação, e não variações fisiológicas relacionadas
593 ao fotoperíodo. A condução do estudo em condições térmicas mais amenas
594 reforça a confiabilidade dos achados proteômicos como consequência direta do
595 estímulo térmico.

596 Os fragmentos testiculares analisados neste estudo foram obtidos de
597 animais submetidos à insulação escrotal como parte de um estudo previamente
598 publicado (12). Nesse trabalho, foi demonstrado que o isolamento térmico
599 promoveu redução do peso testicular e comprometimento da qualidade
600 espermática, incluindo a diminuição da motilidade total, motilidade progressiva e

601 concentração, observados entre 24 horas e 7 dias após o estímulo. Além disso,
602 foram identificadas alterações nos estágios finais da espermatogênese,
603 evidentes 14 dias após a insulação. Esses achados confirmam a eficácia do
604 modelo de estresse térmico induzido por insulação escrotal utilizado no presente
605 estudo.

606 Apesar das discretas alterações no proteoma testicular nas primeiras 24
607 horas, observadas nos contrastes do mapa de calor, verificou-se aumento na
608 abundância da proteína EvC ciliary complex subunit 2. Integrante do complexo
609 estrutural EVC–EVC2, essa proteína regula a via de sinalização Hedgehog
610 (29,30), envolvida no crescimento, diferenciação celular e reparo tecidual,
611 especialmente durante o desenvolvimento embrionário. Embora sua função
612 específica frente ao estresse térmico testicular ainda seja desconhecida, seu
613 papel na transdução de sinal e na organização estrutural sugere que o aumento
614 observado possa refletir uma resposta celular voltada à sobrevivência ou ao
615 reparo frente ao dano térmico.

616 A proteína IF rod domain-containing protein também apresentou maior
617 abundância no grupo de 24 horas. Integrante da família dos filamentos
618 intermediários, a macromolécula exerce função estrutural no citoesqueleto,
619 conferindo suporte mecânico e integridade celular (31,32). O aumento detectado
620 pode indicar que o estresse térmico induziu uma reorganização ou reforço do
621 citoesqueleto das células testiculares, como resposta adaptativa ao choque
622 térmico, fenômeno consistente com estudos que descrevem alterações na
623 arquitetura das células germinativas após hipertermia testicular (33).

624 Outro achado relevante foi o aumento da Phosphoinositide phospholipase
625 C no grupo de 24 horas. Essa enzima hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
626 (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), promovendo
627 liberação de cálcio intracelular e ativação da PKC, elementos-chave de várias
628 vias de sinalização celular (34,35). No contexto de estresse térmico, o aumento
629 dessa enzima pode indicar ativação de vias dependentes de cálcio, como
630 resposta inicial a alterações de permeabilidade de membrana ou a danos
631 celulares induzidos pelo calor. No testículo, essa ativação pode estar relacionada
632 à indução de mecanismos de sobrevivência ou apoptose mediados por cálcio.

633 A Transitional endoplasmic reticulum ATPase, envolvida na degradação
634 de proteínas e manutenção da homeostase no retículo endoplasmático (RE)

635 (36), também apresentou aumento de abundância no grupo de 24 horas. Esse
636 resultado sugere que o insulto térmico elevou a carga de proteínas mal dobradas
637 ou danificadas no RE, ativando vias de remoção e controle de qualidade proteica.

638 De forma oposta, a proteína Inactive C-alpha-formylglycine-generating
639 enzyme 2 apresentou redução de abundância no grupo de 24 horas. Essa
640 enzima participa da regulação de modificações pós-traducionais de sulfatases
641 no lúmen do RE, e sua redução pode indicar disfunção ou diminuição da
642 capacidade de processamento de proteínas secretadas ou de membrana
643 (37,38). Essa queda possivelmente reflete mecanismos compensatórios ou
644 degradação seletiva, contribuindo para o desequilíbrio da homeostase proteica
645 testicular frente ao estresse térmico.

646 A protein disulfide-isomerase, enzima essencial para a formação e
647 rearranjo de pontes dissulfeto durante o dobramento proteico no RE (39),
648 também apresentou menor abundância após 24 horas. Sua disfunção tem sido
649 associada à infertilidade masculina (40), e a redução observada sugere
650 comprometimento da capacidade de dobramento proteico, favorecendo o
651 acúmulo de proteínas mal conformadas, ativação da resposta ao estresse do RE
652 e possível apoptose em células germinativas, achado condizente com modelos
653 de dano testicular por hipertermia.

654 A Glutathione S-transferase apresentou redução de abundância no grupo
655 de 24 horas. Essa enzima tem papel central na detoxificação de produtos da
656 peroxidação lipídica e no controle do estresse oxidativo celular (41). A diminuição
657 observada sugere perda ou consumo da defesa antioxidante, aumentando a
658 vulnerabilidade das células ao dano oxidativo, mecanismo chave no dano
659 testicular induzido por calor.

660 A proteína Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein
661 também apresentou menor abundância após 24 horas. Ela atua na regulação da
662 transcrição mediada pela RNA polimerase II, no processamento de pré-mRNA e
663 na terminação de transcritos (42). Sua redução pode indicar diminuição da
664 atividade de processamento de RNA, refletindo uma possível interferência do
665 estresse térmico na transcrição e maturação de genes essenciais à
666 espermatogênese e à sobrevivência celular.

667 A Endoplasmin, chaperona do RE envolvida no dobramento de proteínas
668 secretadas e de membrana (43), também teve sua abundância reduzida após 24

669 horas, o que sugere uma diminuição da capacidade de reparo proteico no
670 testículo.

671 Por fim, a Phosphoglycerate kinase (PGK), enzima chave da via glicolítica
672 responsável pela conversão de 1,3-bisfosfoglicerato em 3-fosfoglicerato com
673 geração de ATP (44), apresentou redução de abundância no grupo de 24 horas.
674 Isoformas testiculares, como a PGK2, são essenciais para motilidade e função
675 espermática (45). A redução dessa enzima indica queda na eficiência glicolítica
676 e na produção de ATP nas células germinativas e espermatozoides,
677 possivelmente resultando em menor motilidade e viabilidade espermática,
678 conforme relatado em modelos de hipertermia testicular.

679 No momento de 24 horas, a única proteína diferencialmente abundante
680 identificada, considerando $FDR > 0,05$ e $\text{Log}_2FC > 1,5$, foi a Regulation of
681 nuclear pre-mRNA domain-containing protein. Integrante da família RPRD, essa
682 proteína atua na regulação da fosforilação do domínio C-terminal da RNA
683 polimerase II, controlando etapas cruciais da transcrição e do processamento de
684 pré-mRNA (42,46). A redução observada pode comprometer o acoplamento
685 entre transcrição e splicing, afetando a expressão de genes essenciais à
686 espermatogênese e ao reparo celular. Assim, a diminuição dessa proteína
687 sugere um possível impacto na integridade transcricional e na homeostase
688 celular frente ao estresse térmico.

689 Na comparação entre o grupo controle e o grupo de 48 h, o mapa de calor
690 evidenciou alterações relevantes no perfil proteômico testicular, indicando que a
691 elevação da temperatura por 48 h foi suficiente para desencadear respostas
692 moleculares detectáveis.

693 A Heat shock protein beta-1 apresentou maior abundância no grupo de 48
694 h. Essa chaperona impede a agregação proteica, regula a montagem de
695 filamentos de actina e exerce funções antiapoptóticas e antioxidantes (47). Sua
696 expressão é frequentemente induzida em células testiculares e espermatozoides
697 sob estresse oxidativo (14,20), sugerindo que o aumento observado reflete uma
698 resposta adaptativa à hipertermia. Estudos em testículos humanos e modelos
699 experimentais relatam alterações na expressão da HSP27 associadas tanto à
700 sobrevivência quanto ao comprometimento da espermatogênese após insultos
701 térmicos (48).

702 De forma semelhante, a 94 kDa glucose-regulated protein, uma
703 chaperona residente do RE envolvida no dobramento de proteínas secretadas e
704 na montagem de receptores (49), também apresentou maior abundância no
705 grupo de 48 h. Embora seu papel específico no tecido testicular ainda não esteja
706 completamente elucidado, o aumento é consistente com a ativação de
707 mecanismos de proteção frente à hipertermia (50).

708 Por outro lado, a Phosphoglycerate kinase, uma enzima glicolítica
709 essencial para o fornecimento de ATP citoplasmático e presente em isoformas
710 específicas do tecido testicular (como PGK2) com papel na espermatogênese
711 (45,51), apresentou menor abundância no grupo de 48 h. Essa redução sugere
712 diminuição do metabolismo glicolítico local, possivelmente decorrente de dano
713 celular, redistribuição metabólica ou perda de células germinativas
714 metabolicamente ativas. Alterações no metabolismo energético mitocondrial têm
715 sido associadas à perda de motilidade e viabilidade espermática após estresse
716 térmico (52–54). Assim, a redução dessa proteína pode representar um impacto
717 metabólico precoce do calor.

718 A Peroxiredoxin-2, enzima antioxidante que reduz o peróxido de
719 hidrogênio e protege proteínas e lipídios contra oxidação, também apresentou
720 menor abundância no grupo de 48 h. Essa enzima desempenha papel importante
721 na manutenção do equilíbrio redox do ambiente espermatogênico (55), e sua
722 redução pode refletir consumo do sistema antioxidante ou degradação proteica
723 após o estresse térmico. Tal condição favorece o acúmulo de espécies reativas
724 e o dano oxidativo a células germinativas e espermatozoides, conforme
725 demonstrado por estudos que relacionam a disfunção dessa proteína à perda de
726 viabilidade espermática.

727 A Transitional endoplasmic reticulum ATPase, envolvida na remoção de
728 proteínas ubiquitinadas, remodelamento proteico e manutenção da proteostase
729 (56), apresentou menor abundância relativa no grupo de 48 h. Essa redução
730 sugere prejuízo na capacidade celular de direcionar proteínas mal dobradas ao
731 proteassoma, levando ao seu acúmulo e à ativação de vias apoptóticas. No
732 testículo, essa proteína participa do desenvolvimento e da depuração de
733 proteínas danificadas (33), e sua diminuição pode estar associada à perda da
734 qualidade proteica após a hipertermia.

735 De modo consistente, a Protein disulfide-isomerase, enzima que catalisa
736 a formação e o rearranjo de pontes dissulfeto no RE, essencial para o correto
737 dobramento de diversas proteínas, também apresentou menor abundância no
738 grupo de 48 h. Esse achado reforça a hipótese de que, após o estresse térmico,
739 a capacidade de dobramento proteico no RE esteja comprometida, favorecendo
740 o acúmulo de proteínas mal conformadas e a ativação de vias apoptóticas.

741 A Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein apresentou
742 redução semelhante à observada no grupo de 24 h, sugerindo que o
743 comprometimento dessa proteína possa afetar processos transcricionais e pós-
744 transcricionais essenciais à manutenção da espermatogênese.

745 A NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein, envolvida
746 na catálise de reações redox, incluindo a regeneração de NADPH, a defesa
747 antioxidante e o metabolismo lipídico (57), também apresentou menor
748 abundância no grupo de 48 h. Essa redução sugere comprometimento das rotas
749 redox que sustentam os sistemas antioxidantes, exacerbando a vulnerabilidade
750 oxidativa induzida pelo calor. Em conjunto com a diminuição de outras proteínas
751 associadas, esse padrão indica uma perda generalizada da capacidade celular
752 de controlar o estresse oxidativo após 48 h de hipertermia.

753 Por fim, a Hypoxia up-regulated protein 1 (HYOU1), uma chaperona do
754 RE pertencente à família HSP70, com função protetora contra apoptose sob
755 condições de estresse (58), apresentou maior abundância no grupo de 48 h.
756 Esse aumento pode indicar uma tentativa compensatória de proteção celular,
757 embora também possa refletir danos às células que a produzem. Alterações na
758 expressão dessa proteína já foram relatadas em estudos proteômicos
759 reprodutivos e em espermatozoides, associando-a a mecanismos de
760 sobrevivência celular frente a estresses ambientais (59).

761 Os achados do volcano plot do grupo 48 h foram semelhantes aos
762 observados no mapa de calor, com a identificação de três PDAs com expressão
763 reduzida (Hypoxia up-regulated protein 1, Endoplasmin e NADP-dependent
764 oxidoreductase domain-containing protein) e uma proteína com expressão
765 aumentada (94 kDa glucose-regulated protein). Outras proteínas também
766 apresentaram abundância diferencial, incluindo três com expressão reduzida
767 (Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein, Peroxiredoxin-2 e
768 Transitional endoplasmic reticulum ATPase).

769 Como mencionado anteriormente, observa-se um padrão em que
770 chaperonas do retículo endoplasmático e fatores relacionados à manutenção
771 proteica estão alterados, alguns reduzidos e outros aumentados, além de uma
772 diminuição nas proteínas envolvidas na defesa antioxidante e no metabolismo
773 redox. Esse conjunto de alterações suporta um cenário em que o estresse
774 térmico induz uma resposta pró-chaperona imediata, mas simultaneamente leva
775 à exaustão das vias antioxidantes em 48 h, resultando em maior risco de dano
776 oxidativo, falhas no dobramento proteico e potencial morte de células
777 germinativas, fatores que explicam os declínios na função testicular
778 frequentemente relatados em estudos sobre hipertermia.

779 De forma semelhante, a comparação entre os grupos controle e 7 dias
780 também revelou mudanças relevantes no proteoma testicular. Embora não tenha
781 ocorrido uma separação clara entre os grupos, as alterações observadas
782 demonstram que mesmo após 7 dias do início do período de 48 h de insulação
783 escrotal, ainda havia modificações moleculares significativas. Entre as proteínas
784 alteradas, Histone H3 e Histone H4 apresentaram aumento de abundância.
785 Ambas são componentes essenciais do nucleossomo, regulando a compactação
786 da cromatina e o acesso à maquinaria de transcrição. Essas histonas sofrem
787 diversas modificações pós-traducionais, como acetilação e metilação, que
788 controlam a expressão gênica durante a espermatogênese (60,61). As
789 alterações observadas sugerem mudanças na dinâmica da cromatina,
790 possivelmente associadas à menor integridade do DNA espermático e a defeitos
791 funcionais.

792 A proteína Inositol-3-phosphate synthase 1 apresentou comportamento
793 divergente entre suas isoformas, uma com abundância aumentada e outra
794 reduzida, indicando respostas diferenciais. Essa enzima é limitante na
795 biossíntese de mio-inositol, precursor de fosfatidilinositol e de moléculas de
796 sinalização envolvidas na homeostase osmótica e na integridade de membranas
797 sob estresse (62,63). A modulação dessa via pode influenciar a sobrevivência
798 celular e o metabolismo lipídico em condições de hipertermia (64).

799 A Glutathione S-transferase (GST), que atua na conjugação da glutathione
800 a produtos de peroxidação lipídica, sendo fundamental na defesa contra
801 espécies reativas de oxigênio (41,65), também apresentou aumento de
802 abundância no grupo 7d. No testículo e nos espermatozoides, isoformas como a

803 GSTM3 estão associadas à qualidade espermática e à proteção antioxidante
804 (66). Como amplamente descrito, o calor eleva a produção de radicais livres e a
805 peroxidação lipídica; assim, o aumento da GST reflete uma resposta antioxidante
806 compensatória.

807 A proteína L-amino-acid oxidase, também aumentada nesse grupo, oxida
808 aminoácidos gerando H_2O_2 como subproduto, desempenhando funções
809 antimicrobianas, imunomodulatórias e redox (67,68). Esse achado reforça a
810 ativação concomitante das defesas antioxidantes em resposta ao aumento de
811 espécies reativas de oxigênio.

812 A Galectin, igualmente aumentada, pertence à família das lectinas
813 envolvidas em adesão celular, sinalização, modulação imune e maturação
814 espermática. Estudos recentes apontam seu papel na espermatogênese, no
815 estroma testicular e na resposta inflamatória (69,70). O aumento dessa proteína
816 sugere ativação de vias inflamatórias e de remodelamento da matriz extracelular
817 como parte dos processos de reparo celular.

818 A ATP synthase subunit beta, subunidade essencial da ATP sintase
819 mitocondrial, também aumentou no grupo 7d. Por participar da geração de ATP,
820 processos críticos aos espermatozoides devido ao seu alto consumo energético
821 (71,72), seu aumento pode refletir uma resposta compensatória
822 à disfunção mitocondrial induzida pelo estresse térmico, visando restaurar a
823 produção de energia em mitocôndrias sobreviventes.

824 Assim como nos grupos 24 h e 48 h, a Protein disulfide-isomerase
825 apresentou redução de abundância no grupo 7d. Esse resultado indica
826 persistência na perda da capacidade de dobramento correto das proteínas, o
827 que pode levar ao acúmulo de proteínas mal dobradas e à ativação de vias
828 apoptóticas.

829 Os achados do volcano plot foram consistentes com os do heatmap,
830 revelando contudo, apenas três proteínas com diferenças significativas entre os
831 grupos: duas reduzidas (Protein disulfide-isomerase e Inositol-3-phosphate
832 synthase 1) e uma aumentada (Inositol-3-phosphate synthase). Outras
833 proteínas, como Galectin, Histone H3 e L-amino-acid oxidase, também
834 apresentaram maior abundância.

835 Esses resultados reforçam a ideia de que os principais mecanismos
836 envolvidos na resposta testicular ao estresse térmico incluem alterações na

837 homeostase redox, metabolismo de inositol, dobramento proteico, estrutura
838 nuclear, inflamação e metabolismo oxidativo. Em conjunto, os dados sustentam
839 a hipótese de que, após cinco a sete dias após a exposição ao calor, ainda ocorre
840 um processo ativo de adaptação metabólica e molecular de reparo frente aos
841 danos térmicos.

842 Na comparação entre os grupos controle e 14d, o mapa de calor revelou
843 alterações significativas no perfil proteômico testicular. Mesmo após 12–14 dias
844 do insulto térmico, ainda foram detectadas mudanças moleculares relevantes,
845 permitindo uma separação clara entre os grupos na análise de componentes
846 principais.

847 Assim como no grupo 7d, as duas isoformas da Inositol-3-phosphate
848 synthase 1 apresentaram padrões opostos de abundância, uma aumentada e
849 outra reduzida. Esse resultado reforça que, mesmo nesse momento, ainda havia
850 participação de vias relacionadas à resposta ao estresse osmótico e à
851 manutenção da integridade das membranas de sinalização sob dano.

852 De forma semelhante ao observado no grupo 7d, a L-amino-acid oxidase
853 também teve sua abundância aumentada no grupo 14d. Essa enzima oxida
854 aminoácidos e gera H_2O_2 como subproduto, desempenhando papéis
855 antimicrobiano, imuno-modulador e na regulação do balanço redox local. Esse
856 achado sugere que, entre 12 e 14 dias após o insulto térmico, a defesa
857 antioxidante ainda está ativa, acompanhada pelo aumento da produção de
858 espécies reativas de oxigênio.

859 A Mimecan, proteína envolvida na organização e sinalização da matriz
860 extracelular e na interação célula-matriz (73), apresentou aumento de
861 abundância no grupo 14d. Esse achado pode refletir um processo de
862 remodelamento tecidual em resposta ao dano térmico, possivelmente associado
863 ao recrutamento de células imunes e à tentativa de reparação tecidual.

864 A Peptidyl-prolyl cis–trans isomerase, enzima que catalisa a isomerização
865 cis-trans de ligações peptidil-prolina, etapa essencial no dobramento de diversas
866 proteínas (74), também apresentou abundância aumentada no grupo 14d. Esse
867 aumento sugere maior demanda por chaperonas para o manejo de proteínas
868 desnaturadas pelo calor.

869 A Heat shock protein beta-1 mostrou aumento de abundância no grupo
870 14d. Essa chaperona molecular estabiliza filamentos de actina, regula a

871 apoptose por meio da inibição da ativação de caspases e participa da resposta
872 ao estresse oxidativo (47). Seus mecanismos previnem a agregação de
873 proteínas e modulam vias de sobrevivência celular. O aumento observado indica
874 uma resposta adaptativa voltada à proteção contra o estresse térmico e à
875 manutenção da homeostase proteica.

876 A Glutathione transferase, enzima da família envolvida na detoxificação
877 celular por conjugação de glutathione e neutralização de produtos de peroxidação
878 lipídica (41), também apresentou aumento de abundância no grupo 14d. Esse
879 comportamento é coerente com a ativação de defesas antioxidantes,
880 necessárias para contrabalançar o aumento de espécies reativas de oxigênio
881 induzido pelo calor.

882 A Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enzima glicolítica que
883 converte gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato com geração de NADH,
884 exerce papel essencial na motilidade e no metabolismo energético dos
885 espermatozoides (75). Seu aumento de abundância no grupo 14d pode indicar
886 uma resposta compensatória, com intensificação do metabolismo glicolítico para
887 atender à maior demanda energética associada à recuperação celular.

888 Por outro lado, a Transitional endoplasmic reticulum ATPase, proteína
889 essencial para a manutenção da proteostase e para a recuperação de proteínas
890 no retículo endoplasmático (56), apresentou abundância reduzida no grupo 14d.
891 Essa diminuição pode refletir uma capacidade limitada do testículo em lidar com
892 proteínas danificadas, sugerindo que processos apoptóticos ainda estejam
893 ativos 14 dias após o insulto térmico.

894 Os resultados do Volcano plot corroboraram os do mapa de calor,
895 identificando quatro proteínas com abundância diferencial significativa: duas
896 reduzidas (Transitional endoplasmic reticulum ATPase e Inositol-3-phosphate
897 synthase 1) e duas aumentadas (Glutathione transferase e L-amino-acid
898 oxidase). Esses achados indicam a participação de proteínas envolvidas na
899 resposta ao aumento de espécies reativas de oxigênio, no dano ao retículo
900 endoplasmático e em mecanismos compensatórios de chaperonas e
901 detoxificação.

902 Utilizando o proteoma total de cada grupo experimental, foram realizadas
903 análises de enriquecimento por ontologia gênica, permitindo identificar

904 alterações funcionais e biológicas associadas ao estresse térmico testicular em
905 diferentes momentos após a insulação escrotal.

906 No grupo 24 h, a análise de enriquecimento do processo biológico revelou
907 ativação precoce de mecanismos antioxidantes, com destaque para a proteína
908 peroxirredoxina-2 (PRDX2), associada à detoxificação de espécies reativas de
909 oxigênio. Além disso, a fosfoglicerato quinase 1 (PGK1) esteve ligada a
910 processos metabólicos e à sinalização inflamatória, enquanto a proteína
911 interativa HSP70 (ST13) mostrou envolvimento em vias de homeostase proteica
912 e resposta imunológica inicial.

913 Complementando esses achados, a análise da função molecular reforçou
914 o papel central de PRDX2 em atividades antioxidantes, e evidenciou a
915 participação de PGK1 em processos de transferência de fosfato e metabolismo
916 energético. A proteína RPRD1A, por sua vez, foi associada à regulação da
917 atividade transcricional por meio da interação com a RNA polimerase II.

918 No grupo 48 h, observou-se continuidade da resposta antioxidante, com
919 PRDX2 e PRDX4 associadas à detoxificação de oxidantes e regulação da
920 homeostase redox. Proteínas como HYOU1 e HSP90B1 indicaram ativação de
921 mecanismos de resposta ao estresse do retículo endoplasmático, incluindo
922 maturação proteica e degradação. PGK1 manteve sua associação a processos
923 metabólicos, enquanto VCP esteve envolvida em transporte e degradação
924 proteica.

925 A análise da função molecular nesse grupo destacou atividades de ligação
926 a nucleotídeos, atribuídas a HSP90B1 e VCP, sugerindo envolvimento em
927 processos dependentes de energia e chaperonagem. PRDX2 e PRDX4
928 continuaram associadas a funções antioxidantes, e PGK1 reforçou seu papel em
929 vias energéticas. Termos gerais como atividade catalítica e hidrólise de ATP
930 refletiram alterações funcionais mais amplas.

931 Sete dias após o início da insulação, os dados indicaram impacto
932 prolongado em vias relacionadas à reprodução e diferenciação sexual, com
933 proteínas como CYP17A1, YWHAQ e HSPA1L fortemente associadas a esses
934 processos. Além disso, termos ligados à fertilização e maturação de gametas,
935 envolvendo PGK1, HSPA1L e PRDX4, sugerem comprometimento da
936 competência reprodutiva.

937 Alterações na dinâmica nuclear também foram evidenciadas, com
938 destaque para a histona H3.3 (H3F3A), associada à organização cromossômica
939 e remodelação da cromatina. Termos relacionados à biossíntese celular e
940 resposta ao estresse, mediados por HSPA1L e PRDX4, indicam coexistência de
941 respostas reparativas e de remodelação celular.

942 Na função molecular, o termo mais representativo foi ligação a proteínas,
943 com HSPA1L, YWHAQ e H3F3A entre os principais envolvidos. A continuidade
944 da resposta ao estresse oxidativo foi sustentada por PRDX4, PGK1 e CYP17A1,
945 enquanto HSPA1L manteve sua associação à chaperonagem dependente de
946 ATP. Modulações transcricionais e epigenéticas, atribuídas a H3F3A e RPRD1A,
947 reforçam a hipótese de reprogramação celular. Termos como ligação ao
948 nucleossomo e constituição da cromatina indicam alterações nucleares
949 estruturais na recuperação testicular.

950 No grupo 14 dias, os achados apontaram para modulação do metabolismo
951 energético e oxidativo, com PGK1, GSTM4, PRDX4 e ISYNA1 envolvidos em
952 processos metabólicos e catalíticos. Alterações na dinâmica da cromatina e
953 progressão mitótica foram sustentadas por H2BC1, RPRD1A e VCP, enquanto
954 HSPB1 e PRDX4 indicaram manutenção da resposta ao estresse e da
955 homeostase celular.

956 Proteínas tubulínicas como TUBA1B e TUBA8 estiveram associadas à
957 organização do citoesqueleto e transporte intracelular, sugerindo impacto
958 estrutural do estresse térmico. Termos relacionados à biossíntese de
959 macromoléculas e expressão gênica indicaram que a reprogramação celular
960 permanece ativa, possivelmente como mecanismo compensatório de reparo.

961 Na função molecular, o termo predominante foi ligação a proteínas, com
962 HSPB1, VCP, PGK1, RAN e TUBA1B envolvidos em interações críticas para
963 sinalização e estabilidade de complexos macromoleculares. Atividades
964 catalíticas, atribuídas a PRDX4, PGK1, GSTM4 e PPIB, indicaram continuidade
965 de mecanismos adaptativos. Termos de ligação a nucleotídeos, como GTP e
966 nucleotídeos purínicos, associados a RAN, VCP, PGK1 e TUBA8, sugerem
967 impacto em vias dependentes de energia e regulação do ciclo celular.

968 Por fim, termos estruturais atribuídos às tubulinas e o enriquecimento de
969 RNA *polymerase binding*, ligado a RPRD1A, reforçam a persistência de

alterações nucleares e transcricionais, em consonância com os mecanismos de remodelação observados nos períodos anteriores.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a insulação escrotal aguda desencadeia uma resposta proteômica complexa e temporalmente dinâmica no testículo de ovinos, envolvendo mecanismos de estresse oxidativo, proteostase e metabolismo energético. As alterações observadas revelam uma sequência de eventos que inclui resposta adaptativa inicial, progressão do dano celular e ativação de vias de reparo tecidual. Mesmo após 14 dias, persistem sinais de desequilíbrio redox e comprometimento da homeostase proteica, indicando que episódios breves de hipertermia podem gerar impactos prolongados sobre a espermatogênese e a fertilidade masculina. Esses achados ampliam o entendimento sobre os efeitos moleculares do estresse térmico em pequenos ruminantes e reforçam a necessidade de estratégias de manejo frente às mudanças climáticas. Estudos adicionais são essenciais para aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos e validar potenciais biomarcadores de dano testicular induzido por calor.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não existe conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Calvin K, Dasgupta D, Krinner G, Mukherji A, Thorne PW, Trisos C, et al. Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero, editors]. Geneva (CH): Intergovernmental Panel on Climate Change; 2023 Jul.
2. El-Zeftawy M, Mahmoud GB, Hassan M. Impact of thermal stress exposure on seminal quality, antioxidant defence system, TNF- α and TIMP-3 in Ossimi ram. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020 Jul 26;55(7):870–81.

- 1005 3. Delgadillo JA, Abecia JA, Keller M, Chemineau P. Las interacciones socio-
1006 sexuales, alternativa para manipular la reproducción de los pequeños
1007 rumiantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2021;45(4):361–8.
- 1008 4. Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding: Nature's contraceptive. In:
1009 Proceedings of the 1979 Laurentian Hormone Conference. New York (NY):
1010 Elsevier; 1980. p. 1–52.
- 1011 5. Schanbacher BD, Lunstra DD. Seasonal changes in sexual activity and serum
1012 levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *Journal*
1013 *of Animal Science*. 1976 Sep;43(3):644–50.
- 1014 6. Nagashima K. Central mechanisms for thermoregulation in a hot
1015 environment. *Industrial Health*. 2006;44(3):359–67.
- 1016 7. Baêta FC, Souza CF. *Ambiência em edificações rurais: conforto animal*
1017 [Internet]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1997. Disponível
1018 em: <https://books.google.com.br/books?id=S5SQAAAACAAJ>
- 1019 8. McManus CM, Faria DA, Lucci CM, Louvandini H, Pereira SA, Paiva SR. Heat
1020 stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? *Theriogenology*.
1021 2020 Oct 1;155:157–67.
- 1022 9. Titto CG, Veríssimo CJ, Pereira AMF, Geraldo AM, Katiki LM, Titto EAL.
1023 Thermoregulatory response in hair sheep and shorn wool sheep. *Small*
1024 *Ruminant Research*. 2016 Nov 1;144:341–5.
- 1025 10. Kastelic JP, Coulter GH, Cook RB. Scrotal, surface, subcutaneous,
1026 intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology*.
1027 1995;43(6):1117–24.
- 1028 11. Rizzoto G, Ferreira JCP, Codognoto VM, Oliveira KC, Mogollón García HD,
1029 Pupulim AGR, et al. Testicular hyperthermia reduces testosterone
1030 concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls.
1031 *Theriogenology*. 2020 Aug 1;152:64–8.
- 1032 12. Teixeira MB, Ferreira JCP, Codognoto VM, Rossi ES, Pupulim AGR, de
1033 Carvalho JC, et al. Heat stress induced by testicular insulation for 24 or 48
1034 hours rapidly impairs epididymal sperm quality and reduces spermatogenesis
1035 in rams. *Small Ruminant Research*. 2025 Feb;243:107443.
- 1036 13. Freitas AC de, Reolon HG, Abduch NG, Baldi F, Silva RMO, Lourenço D, et
1037 al. Proteomic identification of potential biomarkers for heat tolerance in
1038 Caracu beef cattle using high and low thermotolerant groups. *BMC*
1039 *Genomics*. 2024 Dec 1;25(1):1–14.
- 1040 14. Liu S, Liu Y, Bao E, Tang S. The protective role of heat shock proteins against
1041 stresses in animal breeding. *International Journal of Molecular Sciences*.
1042 2024 Aug 1;25(15):8705.
- 1043 15. Rizzoto G, Shahat AM, Kastelic JP, Carlos J, Ferreira P da A, et al.
1044 Atualização sobre o estresse térmico testicular: Updates on testicular heat

- stress. In: *Anais da VI Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal*; 2022 Jun 10–11; Campinas, SP. Campinas (SP): Associação Brasileira de Andrologia Animal; 2022. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2022.016.
16. Wang M, Su P. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2018 Mar 4;64(2):93–102.
17. Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH, Saacke RG. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. *Theriogenology*. 1996;45(5):935–42.
18. Yang CX, Chen L, Mou Q, Yang YW, Wang Y, Yin Z, et al. HSP90AA1 promotes viability and lactate production but inhibits hormone secretion of porcine immature Sertoli cells. *Theriogenology*. 2022 Dec;194:64–74.
19. Li W, Zhang X, Shen J, Weng X. Effect of season on testicular development and spermatogenesis in Hu sheep: Insights from antioxidant indices, oxylipins, and transcriptomics. *Animals (Basel)*. 2025 Sep 27;15(19):2824.
20. Reolon HG, Abduch NG, Freitas AC de, Silva RMO, Fragomeni BO, Lourenço D, et al. Proteomic changes of the bovine blood plasma in response to heat stress in a tropically adapted cattle breed. *Frontiers in Genetics*. 2024;15:1542386.
21. Song Y, Zhao X, Aihemaiti A, Haire A, Gao Y, Niu C, et al. The mechanism of heat stress resistance during spermatogenesis in Turpan Black sheep. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022 Jun 13;9:925277. doi:10.3389/fvets.2022.925277.
22. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3ª ed. Belo Horizonte (MG): CBRA; 2013. 104 p.
23. Luo S, Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie Blue and Fast Green. *Analytical Biochemistry*. 2006 Mar;350(2):233–8. doi:10.1016/j.ab.2006.01.006.
24. Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*. 1985 Sep;6(9):427–48. doi:10.1002/elps.1150060905.
25. Carvalho MG, Silva KM, Aristizabal VHV, Ortiz PEO, Paranzini CS, Melchert A, et al. Effects of obesity and diabetes on sperm cell proteomics in rats. *Journal of Proteome Research*. 2021 May 7;20(5):2628–42. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00986.

- 1084 26. Lim CL. Fundamental concepts of human thermoregulation and adaptation to
 1085 heat: A review in the context of global warming. *International Journal of*
 1086 *Environmental Research and Public Health*. 2020 Oct 24;17(21):7795.
 1087 doi:10.3390/ijerph17217795.
- 1088 27. Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Imtiwati, et al. Impact of heat
 1089 stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary*
 1090 *World*. 2016 Mar;9(3):260–8. doi:10.14202/vetworld.2016.260-268.
- 1091 28. Balaro MFA, Fonseca JF da, Oba E, Cardoso EC da C, Brandão FZ. Is the
 1092 Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast?
 1093 *Tropical Animal Health and Production*. 2014 Dec;46(8):1533–7.
 1094 doi:10.1007/s11250-014-0668-y.
- 1095 29. Blair HJ, Tompson S, Liu YN, Campbell J, MacArthur K, Ponting CP, et al.
 1096 Evc2 is a positive modulator of Hedgehog signalling that interacts with Evc at
 1097 the cilia membrane and is also found in the nucleus. *BMC Biology*. 2011 Feb
 1098 28;9:14. doi:10.1186/1741-7007-9-14.
- 1099 30. Pusapati GV, Kong JH, Patel BB, Krishnan A, Sagner A, Kinnebrew M, et al.
 1100 CRISPR screens uncover genes that regulate target cell sensitivity to the
 1101 morphogen Sonic Hedgehog. *Developmental Cell*. 2018 Jan;44(2):271–
 1102 86.e7. doi:10.1016/j.devcel.2017.12.003.
- 1103 31. Vermeire PJ, Stalmans G, Lilina AV, Fiala J, Novak P, Herrmann H, et al.
 1104 Molecular interactions driving intermediate filament assembly. *Cells*. 2021
 1105 Sep 17;10(9):2457. doi:10.3390/cells10092457.
- 1106 32. Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aepli U. Intermediate filaments:
 1107 primary determinants of cell architecture and plasticity. *The Journal of Clinical*
 1108 *Investigation*. 2009 Jul 1;119(7):1772–83. doi:10.1172/JCI38214.
- 1109 33. Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis,
 1110 fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone.
 1111 *Microscopy Research and Technique*. 2003 May;61(1):88–102.
 1112 doi:10.1002/jemt.10318.
- 1113 34. Cocco L, Follo MY, Manzoli L, Suh PG. Phosphoinositide-specific
 1114 phospholipase C in health and disease. *Journal of Lipid Research*. 2015 Oct
 1115 1;56(10):1853–60. doi:10.1194/jlr.R057984.
- 1116 35. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual*
 1117 *Review of Biochemistry*. 2001 Jun;70(1):281–312.
 1118 doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.281.
- 1119 36. Braxton JR, Southworth DR. Structural insights of the p97/VCP AAA+
 1120 ATPase: how adapter interactions coordinate diverse cellular functionality.
 1121 *The Journal of Biological Chemistry*. 2023 Nov;299(11):105182.
 1122 doi:10.1016/j.jbc.2023.105182.
- 1123 37. Mariappan M, Preusser-Kunze A, Balleininger M, Eiselt N, Schmidt B, Gande
 1124 SL, et al. Expression, localization, structural, and functional characterization

- 1125 of pFGE, the paralog of the C α -formylglycine-generating enzyme. *The*
 1126 *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Apr;280(15):15173–9.
 1127 doi:10.1074/jbc.M414011200.
- 1128 38. Zito E, Fraldi A, Pepe S, Annunziata I, Kobinger G, Di Natale P, et al.
 1129 Sulphatase activities are regulated by the interaction of sulphatase-modifying
 1130 factor 1 with SUMF2. *EMBO Reports*. 2005 Jul;6(7):655–60.
 1131 doi:10.1038/sj.embor.7400444.
- 1132 39. Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochimica et*
 1133 *Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*. 2004 Jun 1;1699(1–2):35–44.
 1134 doi:10.1016/j.bbapap.2003.12.004.
- 1135 40. Zhang Y, Yang A, Zhao Z, Chen F, Yan X, Han Y, et al. Protein disulfide
 1136 isomerase is essential for spermatogenesis in mice. *JCI Insight*. 2024 Jun
 1137 24;9(12):e177743. doi:10.1172/jci.insight.177743.
- 1138 41. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual Review*
 1139 *of Pharmacology and Toxicology*. 2005 Jan;45(1):51–88.
 1140 doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- 1141 42. Ni Z, Olsen JB, Guo X, Zhong G, Ruan ED, Marcon E, et al. Control of the
 1142 RNA polymerase II phosphorylation state in promoter regions by CTD
 1143 interaction domain-containing proteins RPRD1A and RPRD1B. *Transcription*.
 1144 2011 Sep;2(5):237–42. doi:10.4161/trns.2.5.17704.
- 1145 43. Chong LP, Wang Y, Gad N, Anderson N, Shah B, Zhao R. A highly charged
 1146 region in the middle domain of plant endoplasmic reticulum (ER)-localized
 1147 heat-shock protein 90 is required for resistance to tunicamycin or high
 1148 calcium-induced ER stresses. *Journal of Experimental Botany*. 2015 Jan
 1149 1;66(1):113–24. doi:10.1093/jxb/eru401.
- 1150 44. Rojas-Pirela M, Andrade-Alviárez D, Rojas V, Kemmerling U, Cáceres AJ,
 1151 Michels PAM, et al. Phosphoglycerate kinase: structural aspects and
 1152 functions, with special emphasis on the enzyme from Kinetoplastea. *Open*
 1153 *Biology*. 2020 Nov 1;10(11):200298. doi:10.1098/rsob.200298.
- 1154 45. Salisbury GW, Hart RG, Lodge JR. The spermatozoon. *Perspectives in*
 1155 *Biology and Medicine*. 1977 Mar;20(3):372–93. doi:10.1353/pbm.1977.0004.
- 1156 46. Ni Z, Xu C, Guo X, Hunter GO, Kuznetsova OV, Tempel W, et al. RPRD1A
 1157 and RPRD1B are human RNA polymerase II C-terminal domain scaffolds for
 1158 Ser5 dephosphorylation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2014
 1159 Aug;21(8):686–95. doi:10.1038/nsmb.2853.
- 1160 47. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, et
 1161 al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective
 1162 activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation.
 1163 *The Journal of Biological Chemistry*. 1999 Jul;274(27):18947–56.
 1164 doi:10.1074/jbc.274.27.18947.

- 1165 48. Adly MA, Assaf HA, Hussein MRA. Heat shock protein 27 expression in the
1166 human testis showing normal and abnormal spermatogenesis. *Cell Biology*
1167 *International*. 2008 Oct;32(10):1247–55. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.009.
- 1168 49. Pugh KW, Alnaed M, Brackett CM, Blagg BSJ. The biology and inhibition of
1169 glucose-regulated protein 94/gp96. *Medicinal Research Reviews*. 2022 Nov
1170 1;42(6):2007–24. doi:10.1002/med.21909.
- 1171 50. Kim B, Park K, Rhee K. Heat stress response of male germ cells. *Cellular and*
1172 *Molecular Life Sciences*. 2013 Aug;70(15):2623–36. doi:10.1007/s00018-
1173 012-1179-8.
- 1174 51. Danshina PV, Geyer CB, Dai Q, Goulding EH, Willis WD, Kitto GB, et al.
1175 Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male
1176 fertility in mice. *Biology of Reproduction*. 2010 Jan;82(1):136–45.
1177 doi:10.1095/biolreprod.109.079699.
- 1178 52. Capela L, Leites I, Romão R, Lopes-da-Costa L, Pereira RMLN. Impact of
1179 heat stress on bovine sperm quality and competence. *Animals*. 2022 Apr
1180 9;12(8):975. doi:10.3390/ani12080975.
- 1181 53. Durairajanayagam D, Singh D, Agarwal A, Henkel R. Causes and
1182 consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*. 2021 Feb
1183 8;53(1):e13666. doi:10.1111/and.13666.
- 1184 54. Gong Y, Guo H, Zhang Z, Zhou H, Zhao R, He B. Heat stress reduces sperm
1185 motility via activation of glycogen synthase kinase-3 α and inhibition of
1186 mitochondrial protein import. *Frontiers in Physiology*. 2017 Sep 22;8:718.
1187 doi:10.3389/fphys.2017.00718.
- 1188 55. O’Flaherty C. Peroxiredoxins: hidden players in the antioxidant defence of
1189 human spermatozoa. *Basic and Clinical Andrology*. 2014 Dec;24(1):4.
1190 doi:10.1186/2051-4190-24-4.
- 1191 56. Van Den Boom J, Meyer H. VCP/p97-mediated unfolding as a principle in
1192 protein homeostasis and signaling. *Molecular Cell*. 2018 Jan;69(2):182–94.
1193 doi:10.1016/j.molcel.2017.10.028.
- 1194 57. Sellés Vidal L, Kelly CL, Mordaka PM, Heap JT. Review of NAD(P)H-
1195 dependent oxidoreductases: properties, engineering and application.
1196 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2018
1197 Feb;1866(2):327–47. doi:10.1016/j.bbapap.2017.11.005.
- 1198 58. Zuo D, Subjeck J, Wang XY. Unfolding the role of large heat shock proteins:
1199 new insights and therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*. 2016 Mar
1200 1;7:75. doi:10.3389/fimmu.2016.00075.
- 1201 59. Naaby-Hansen S, Herr JC. Heat shock proteins on the human sperm surface.
1202 *Journal of Reproductive Immunology*. 2010 Jan;84(1):32–40.
1203 doi:10.1016/j.jri.2009.08.006.

- 1204 60. Shirakata Y, Hiradate Y, Inoue H, Sato E, Tanemura K. Histone H4
1205 modification during mouse spermatogenesis. *Journal of Reproduction and*
1206 *Development*. 2014;60(5):383–7. doi:10.1262/jrd.2014-066.
- 1207 61. Weil PP, Pembaur A, Wirth B, Oetjen E, Büsscher H, Zirngibl K, et al. Histone
1208 variant H3.5 in testicular cell differentiation and its interactions with histone
1209 chaperones. *Scientific Reports*. 2024 Dec 19;14(1):30564.
1210 doi:10.1038/s41598-024-57397-9.
- 1211 62. Valluru R, Van Den Ende W. Myo-inositol and beyond – emerging networks
1212 under stress. *Plant Science*. 2011 Oct;181(4):387–400.
1213 doi:10.1016/j.plantsci.2011.07.009.
- 1214 63. Deranieh RM, He Q, Caruso JA, Greenberg ML. Phosphorylation regulates
1215 myo-inositol-3-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*.
1216 2013 Sep;288(37):26822–33. doi:10.1074/jbc.M113.473686.
- 1217 64. Suliman M, Case KC, Schmidtke MW, Lazcano P, Onu CJ, Greenberg ML.
1218 Inositol depletion regulates phospholipid metabolism and activates stress
1219 signaling in HEK293T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular*
1220 *and Cell Biology of Lipids*. 2022 Jun;1867(6):159137.
1221 doi:10.1016/j.bbalip.2022.159137.
- 1222 65. Llavanera M, Mateo-Otero Y, Bonet S, Barranco I, Fernández-Fuertes B,
1223 Yeste M. The triple role of glutathione S-transferases in mammalian male
1224 fertility. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020 Jun;77(12):2331–42.
1225 doi:10.1007/s00018-019-03360-6.
- 1226 66. Fafula R, Paranyak N, Besedina A, Vorobets D, Iefremova U, Onufrovych O,
1227 et al. Biological significance of glutathione S-transferases in human sperm
1228 cells. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2019;12(1):24–30.
1229 doi:10.4103/jhrs.JHRS_113_18.
- 1230 67. Zhang H, Liu H, Kataoka S, Kinukawa M, Uchiyama K, Kambe J, et al. L-
1231 amino acid oxidase 1 in sperm is associated with reproductive performance
1232 in male mice and bulls. *Biology of Reproduction*. 2021 May 7;104(5):1154–
1233 61. doi:10.1093/biolre/ioaa246.
- 1234 68. Aitken JB, Naumovski N, Curry B, Grupen CG, Gibb Z, Aitken RJ.
1235 Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa. *Biology*
1236 *of Reproduction*. 2015 May;92(5):125. doi:10.1095/biolreprod.114.126052.
- 1237 69. Fijak M, Hasan H, Meinhardt A. Galectin-1 and galectin-3 in male
1238 reproduction: impact in health and disease. *Seminars in Immunopathology*.
1239 2025 Dec;47(1):6. doi:10.1007/s00281-025-01138-8.
- 1240 70. Lei T, Blois SM, Freitag N, Bergmann M, Bhushan S, Wahle E, et al. Targeted
1241 disruption of galectin 3 in mice delays the first wave of spermatogenesis and
1242 increases germ cell apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021
1243 Apr;78(7):3621–35. doi:10.1007/s00018-020-03734-1.

- 1244 71. Vahedi Raad M, Firouzabadi AM, Tofighi Niaki M, Henkel R, Fesahat F. The
 1245 impact of mitochondrial impairments on sperm function and male fertility: a
 1246 systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2024 Jul
 1247 17;22(1):83. doi:10.1186/s12958-024-01213-z.
- 1248 72. Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Unanian MM, Kastelic JP. Effects of
 1249 scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular
 1250 echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. *Animal*
 1251 *Reproduction Science*. 2003 Nov 20;79(1–2):1–15. doi:10.1016/S0378-
 1252 4320(03)00082-1.
- 1253 73. Kampmann A, Fernández B, Deindl E, Kubin T, Pipp F, Eitenmüller I, et al.
 1254 The proteoglycan osteoglycin/mimecan is correlated with arteriogenesis.
 1255 *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2009 Feb;322(1–2):15–23.
 1256 doi:10.1007/s11010-008-9936-y.
- 1257 74. Fischer G. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and their effectors.
 1258 *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1994 Aug
 1259 2;33(14):1415–36. doi:10.1002/anie.199414151.
- 1260 75. Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, et al.
 1261 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic
 1262 enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the*
 1263 *National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Nov
 1264 23;101(47):16501–6. doi:10.1073/pnas.0407708101.