

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

**Impacto do Estresse Térmico Espermatóico sobre o Proteoma de Embriões
Bovinos**

VITOR HUGO RODRIGUES BRANCO DE MIRANDA

Botucatu, SP
Julho - 2026

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

Impacto do Estresse Térmico Espermático sobre o Proteoma de Embriões Bovinos

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro
Ferreira
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana
Ferreira de Souza

Botucatu, SP
Julho - 2026

M672i	Miranda, Vitor Hugo Impacto do Estresse Térmico Espermatóico sobre o Proteoma de Embriões Bovinos / Vitor Hugo Miranda. -- Botucatu, 2026 84 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: João Carlos Ferreira Coorientadora: Fabiana Souza 1. Reprodução animal. 2. Biotecnologia animal. 3. Embrião. 4. Proteômica. 5. Estresse térmico. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Nome do autor: Vitor Hugo Rodrigues Branco de Miranda

Título: IMPACTO DO ESTRESSE TÉRMICO ESPERMÁTICO SOBRE O
PROTEOMA DE EMBRIÕES BOVINOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

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

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

Membro Titular

Central Bela Vista - Qualidade e processamento de sêmen, Botucatu/SP

Prof. Dra. Viviane Maria Codognoto

Membro Titular

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

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Membro Suplente

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

Prof. Dra. Thaisy Tino Dellaqua

Membro Suplente

TransOva Genetics Uberaba/MG

Data da Defesa: 27 de julho de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder força, saúde mental e equilíbrio ao longo desta trajetória, especialmente nos momentos mais desafiadores.

Aos meus pais, Donizete e Francinete, pelo amor, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim. Nada disso seria possível sem a base que vocês me deram.

À minha irmã, Isabela, pelo carinho, companheirismo e apoio constantes.

Ao meu orientador, Prof. João Carlos, pela orientação, pelas contribuições científicas e pela confiança durante o desenvolvimento desta dissertação.

À Prof. Dra. Fabiana, minha coorientadora, pelo suporte, disponibilidade e pelas valiosas contribuições ao longo deste trabalho.

Ao Prof. José Buratini por abrir as portas do Laboratório de Fisiologia Ovariana e tornar possível o desenvolvimento dos meus experimentos,

Ao Prof. Renan Denadai pelo apoio concedido para realização do experimento.

À minha colega de projeto, Thainá, pela parceria, troca de conhecimentos e colaboração durante a realização desta pesquisa.

Aos meus colegas e grandes amigos Marcos, Larysse e Viviane, pelo apoio, pela amizade e pela presença ao longo dessa jornada. À Viviane, em especial, agradeço o cuidado, acolhimento e por ter se tornado uma verdadeira irmã ao longo desse caminho.

À minha namorada Giovanna, que foi meu porto seguro, que me apoiou em diversos momentos difíceis, e sempre me incentivou a nunca desistir.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta dissertação.

Agradeço também à Botupharma pela parceria no fornecimento dos meios de congelamento espermática e produção *in vitro* de embriões, e ao Frigorífico Fribordogue e Frigol pelo fornecimento dos ovários, sem os quais este projeto não seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

“Para que o mal triunfe basta que os bons não façam nada. ...” Edmund Burke.

RESUMO

MIRANDA, V.H.R.B **IMPACTO DO ESTRESSE TÉRMICO ESPERMÁTICO SOBRE O PROTEOMA DE EMBRIÕES BOVINOS**. Botucatu – SP. 2026. 78 p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O estresse térmico é um dos principais fatores ambientais que comprometem a eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde altas temperaturas e umidade desafiam a manutenção da homeostase. Em touros, esse efeito assume relevância particular devido à elevada termossensibilidade da espermatogênese, processo que depende da manutenção da temperatura testicular abaixo da temperatura corporal. Quando a capacidade termorregulatória é excedida, a hipertermia testicular pode induzir alterações progressivas na espermatogênese e na qualidade do sêmen, com reflexos sobre a motilidade, integridade celular e competência fertilizante. Além disso, evidências recentes indicam que os efeitos do estresse térmico paterno extrapolam os parâmetros seminais convencionais, afetando a contribuição molecular do espermatozoide para o desenvolvimento embrionário inicial. Como diferenças entre *Bos taurus* e *Bos indicus* podem modular a intensidade dessas respostas, estudos comparativos que integrem avaliação seminal, produção *in vitro* de embriões e proteômica tornam-se relevantes para compreender os impactos do calor sobre a fertilidade bovina. O presente estudo avaliou os efeitos temporais do estresse térmico testicular induzido por insulação escrotal por 48 horas sobre a qualidade espermática, a produção *in vitro* de embriões e o perfil proteômico embrionário de touros holandeses (HPB; *B. taurus*) e nelore (NEL; *B. indicus*). Oito touros, quatro de cada raça, foram submetidos à insulação escrotal, com coletas seminais realizadas em D-5, D7, D28, D49 e D63. As amostras foram avaliadas pelo sistema Análise computadorizada da motilidade espermática (Computer-assisted semen analysis; CASA), criopreservadas e utilizadas na produção *in vitro* de embriões, cujos blastocistos foram posteriormente submetidos à análise proteômica. A temperatura média da superfície escrotal durante a insulação foi semelhante entre as raças (HPB: $36,6 \pm 0,01$ e Nelore: $36,2 \pm 0,01$ °C). Em ambos os grupos, o estresse térmico reduziu a motilidade total, a motilidade progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos, além de aumentar os defeitos espermáticos em D28, com recuperação a partir de D49. A taxa de blastocisto não foi alterada no grupo HPB, mas foi reduzida no grupo NEL quando foram utilizados ejaculados criopreservados em D7 e D49. A análise proteômica identificou 357 proteínas nos embriões do grupo HPB e 385 no grupo NEL. Dentre essas, 41 proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas no HPB e 18 no NEL, com predomínio das alterações em D7H e D63N, respectivamente, evidenciando respostas temporais distintas entre as raças. Em conjunto, os resultados demonstram que o estresse térmico escrotal compromete transitoriamente a qualidade seminal e repercute sobre o desenvolvimento embrionário e o proteoma dos embriões, com dinâmica dependente da raça.

Palavras-chave: Hipertermia testicular, Proteômica, Produção *in vitro*

ABSTRACT

MIRANDA, V.H.R.B **SPERM HEAT STRESS IMPACT ON THE PROTEOME OF BOVINE EMBRYOS**. Botucatu – SP. 2026. 78 p. July. Defense (Master's Degree) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University.

Heat stress is one of the main environmental factors compromising the productive and reproductive efficiency of cattle, especially in tropical and subtropical regions, where high temperatures and humidity challenge the maintenance of homeostasis. In bulls, this effect is particularly relevant due to the high thermosensitivity of spermatogenesis, a process that depends on maintaining testicular temperature below body temperature. When thermoregulatory capacity is exceeded, testicular hyperthermia can induce progressive changes in spermatogenesis and semen quality, affecting motility, cellular integrity, and fertilizing competence. Furthermore, recent evidence indicates that the effects of paternal heat stress extend beyond conventional seminal parameters, affecting the molecular contribution of sperm to early embryonic development. Since differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* may modulate the intensity of these responses, comparative studies integrating seminal evaluation, in vitro embryo production, and proteomics become relevant for understanding the impacts of heat on bovine fertility. The present study evaluated the temporal effects of testicular heat stress induced by scrotal insulation for 48 hours on sperm quality, in vitro embryo production, and embryonic proteomic profile of Holstein (HPB; *B. taurus*) and Nelore (NEL; *B. indicus*) bulls. Eight bulls, four of each breed, underwent scrotal insulation, with semen collections performed on D-5, D7, D28, D49, and D63. Samples were evaluated using the Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system, cryopreserved, and used for in vitro embryo production, whose blastocysts were subsequently subjected to proteomic analysis. The mean scrotal surface temperature during insulation was similar between breeds (HPB: $36,6 \pm 0,01$ e Nelore: $36,2 \pm 0,01$ °C). In both groups, heat stress reduced total motility, progressive motility, and the percentage of rapid sperm, in addition to increasing sperm defects at D28, with recovery from D49 onward. Blastocyst rate was not altered in the HPB group but was reduced in the NEL group when cryopreserved ejaculates from D7 and D49 were used. Proteomic analysis identified 357 proteins in HPB group embryos and 385 in the NEL group. Among these, 41 differentially abundant proteins were identified in HPB and 18 in NEL, with changes predominating at D7H and D63N, respectively, evidencing distinct temporal responses between breeds. Together, the results demonstrate that scrotal heat stress transiently compromises seminal quality and impacts embryonic development and the embryo proteome, with breed-dependent dynamics.

Keywords: Testicular hyperthermia, Embryo proteomics, *in vitro* embryo production

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACE - enzima conversora de angiotensina (Angiotensin-converting enzyme)

AGC - controle automático de ganho (Automatic Gain Control)

AIC - critério de informação de Akaike

ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ANOVA - análise de variância

ASAH1 - N-acilesfingosina amidohidrolase 1 (ceramidase ácida)

ATF6 - fator de transcrição ativador 6

ATP - adenosina trifosfato

BCF - frequência de batimento da cauda

BIC - critério de informação Bayesiano

BP - processo biológico (Biological Process)

CASA - análise seminal computadorizada (Computer-Assisted Sperm Analysis)

CC - componente celular (Cellular Component)

CCOs - complexos cumulus-oócito

CIV - cultivo *in vitro*

CKMT - creatina quinase mitocondrial tipo U

COX5A - subunidade 5A da citocromo c oxidase

CS - citrato sintase

D0 - dia zero (início da insulação escrotal)

DIA - aquisição independente de dados (Data-Independent Acquisition)

DNA - ácido desoxirribonucleico

DTT - ditionitrito

EPM - erro-padrão da média

EROs/ROS - espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species)

EUA - Estados Unidos da América

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura

FDR - taxa de descoberta falsa (False Discovery Rate)

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GCL - glutamato-cisteína ligase

GLMM - modelos lineares generalizados mistos

GO - ontologia gênica (Gene Ontology)

GTF2H2 - subunidade 2 do fator de transcrição geral IIH

HPB - Holandês / Holandês preto e branco

HSP70/HSPA1A - proteína de choque térmico 70 (Heat Shock Protein family A member 1A)

HSP90 - proteína de choque térmico 90

HSPB1 - proteína de choque térmico beta-1

IDE - enzima degradadora de insulina

IE - insulação escrotal

IGF(-I) - fator de crescimento semelhante à insulina (tipo I)

IGFBPs - proteínas de ligação ao IGF

IL-17 - interleucina 17

ITIH2 - cadeia pesada 2 do inibidor de inter-alfa-tripsina

ITU - índice de temperatura e umidade

IVC - cultivo de embriões in vitro (meio)

IVP - produção in vitro de embriões (sigla em inglês)

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LH - hormônio luteinizante

LIN - linearidade

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MDH - malato desidrogenase

MF - função molecular (Molecular Function)

miRNA - microRNA

MP - motilidade progressiva

MS/MS - espectrometria de massas em tandem

MT - motilidade total

MYZAP - proteína de junção aderente miocárdica (Myocardial Zonula Adherens Protein)

NEL - Nelore

NCE - energia de colisão normalizada (Normalized Collision Energy)

NER - reparo por excisão de nucleotídeos

NUCB1 - nucleobindina-1

OXPHOS - fosforilação oxidativa

P/p - valor de probabilidade estatística

PCA - análise de componentes principais

PC1/PC2 - primeiro/segundo componente principal
PDA - proteínas diferencialmente abundantes
PEP - posterior error probability
PHB1 - proibitina 1
PI3K - fosfoinosítídeo 3-quinase
PIV - produção in vitro
PIVE - produção in vitro de embriões
PLS-DA - análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PPI - interação proteína-proteína (Protein-Protein Interaction)
RAP - espermatozoides rápidos
RE - retículo endoplasmático
RHOBTB/RHOBTB2 - Rho-related BTB domain-containing protein
RNA - ácido ribonucleico
S1P/S1PR4 - esfingosina-1-fosfato / receptor 4 de esfingosina-1-fosfato
SCMC - complexo do citoplasma subcortical materno
SHR - receptores de hormônios esteroides (Steroid Hormone Receptors)
STR - retilinearidade
TCA - ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs)
TFIIH - fator de transcrição IIH
TLE6 - Transducin-Like Enhancer protein 6
TRAP(- α) - complexo associado ao translocon (subunidade alfa)
UNESP - Universidade Estadual Paulista
UPR - resposta a proteínas mal-enoveladas (Unfolded Protein Response)
VAP - velocidade média do trajeto
VCL - velocidade curvilínea
VDAC2 - canal aniônico dependente de voltagem 2
VIP - importância da variável na projeção (Variable Importance in Projection)
VSL - velocidade retilínea
ZMYM3 - proteína com dedo de zinco tipo MYM, membro 3
ZP2/ZP3/ZP4 - glicoproteínas da zona pelúcida 2, 3 e 4

SUMÁRIO

Impacto do Estresse Térmico Espermático sobre o Proteoma de Embriões Bovinos	3
CAPÍTULO 1	i
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Estresse térmico em bovinos.....	5
2.2 Diferenças entre <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> frente ao estresse térmico	7
2.3 Termorregulação testicular em touros	7
2.3.2 Gradientes térmicos escrotais e testiculares	9
2.4 Ciclo espermatogênico em bovinos.....	10
2.5 Cronologia dos danos induzidos pelo estresse térmico	11
2.8 Lacunas de conhecimento e implicações para a pesquisa reprodutiva .	16
3. Considerações finais	16
4. HIPÓTESE E OBJETIVOS	17
4.1. Hipóteses.....	17
4.2. Objetivo geral.....	17
4.3. Objetivos específicos.....	17
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2	32
ARTIGO CIENTÍFICO	32
Impacto do Estresse Térmico Espermático sobre o Proteoma de Embriões Bovinos	32
1. Introdução	35
2. Material e métodos	36
2.1 Aspectos éticos.....	36
2.2 <i>Desenho Experimental</i>	37
2.3 Insulação Escrotal e Análise Espermática.....	37
2.4 Avaliação Seminal	38
2.5 Criopreservação do Sêmen	38
2.6 Produção <i>In Vitro</i> de Embriões (PIV).....	38
2.7 Proteômica.....	40
2.8 Digestão triptica.....	41

2.9 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	41
2.10 Análise estatística	42
3. RESULTADOS	44
3.1 Resultados da insulação escrotal	44
4. Taxa de produção de Embriões.....	45
5. Proteômica Embrionária	46
5.1 Holandeses	46
5.2 Nelore	50
6. Discussão	53
7. Conclusão	63
8. REFERÊNCIAS	64
9. Material suplementar.....	81

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A pecuária bovina sustenta parcela expressiva da produção global de proteína animal e desempenha papel estratégico para segurança alimentar e economia, sobretudo em países de clima tropical e subtropical (FAO, 2019). Nesse cenário, a eficiência reprodutiva é um dos pilares da sustentabilidade do sistema produtivo, pois determina o número de animais nascidos, a reposição do rebanho e o aproveitamento de biotecnologias como inseminação artificial e produção in vitro de embriões (PIVE) (WEST, 2003). Entretanto, entre os fatores que limitam a performance reprodutiva, o estresse térmico se destaca como um dos mais relevantes, uma vez que a combinação de temperatura elevada, umidade, radiação solar e ventilação insuficiente pode ultrapassar a capacidade termorregulatória dos animais (KADZERE *et al.*, 2002), desencadeando alterações sistêmicas e perdas produtivas (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017; WEST, 2003).

A exposição ao calor promove respostas fisiológicas destinadas à dissipação térmica, como o aumento da sudorese, da frequência respiratória e da ingestão de água (WEST, 2003; RUST, 2019), além de mudanças comportamentais e redistribuição do fluxo sanguíneo para regiões periféricas (GRANDIN, 2016). Apesar de serem mecanismos adaptativos, esses ajustes frequentemente acarretam efeitos colaterais, incluindo redução do consumo alimentar, alterações endócrino-metabólicas e maior suscetibilidade ao estresse oxidativo (MADER, 2014; FERNANDEZ-NOVO *et al.*, 2020). Em sistemas intensivos, nos quais o microclima pode ser desfavorável e a possibilidade de compensação comportamental é limitada, as consequências do estresse térmico tendem a ser ainda mais marcantes, afetando tanto o bem-estar quanto a produtividade (MADER, 2014; GRANDIN, 2016). Além disso, o contexto de mudanças climáticas, com aumento da temperatura média e maior frequência de ondas de calor, amplia a urgência de compreender mecanismos e impactos reprodutivos associados ao ambiente térmico (FAO, 2019).

Para monitorar o desafio térmico, é comum a utilização do índice de temperatura e umidade (ITU/THI) (BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007). Embora útil, esse índice não contempla variáveis importantes (por exemplo, radiação, vento, sombreamento, características da pelagem e adaptação individual), podendo subestimar o impacto real do calor (GAUGHAN *et al.*, 2008;

35 DIKMEN; HANSEN, 2009). Por isso, a interpretação do estresse térmico,
36 especialmente em estudos reprodutivos, torna-se mais robusta quando
37 combinada a marcadores do próprio animal, como temperatura corporal ou
38 ruminal, frequência respiratória, ingestão e indicadores metabólicos (BOVA et
39 al., 2014; FERNANDEZ-NOVO ET AL., 2020). Essa limitação metodológica é
40 particularmente relevante na reprodução masculina, em que variações térmicas
41 relativamente discretas podem causar efeitos biológicos significativos (Lemal et
42 al., 2023).

43 No macho bovino, a manutenção da fertilidade depende criticamente da
44 termorregulação escrotal (SETCHELL, 2006). A espermatogênese é altamente
45 termossensível e requer temperaturas testiculares inferiores à temperatura
46 corporal (WAITES, 1991). Para garantir esse gradiente, o organismo utiliza um
47 sistema multicomponente que integra características anatômicas do escroto
48 (pele fina, baixa gordura subcutânea e elevada densidade de glândulas
49 sudoríparas), musculatura especializada (túnica dartos e músculo cremáster)
50 (KASTELIC; BYRNE COOK; COULTER, 1997) e um mecanismo vascular
51 eficiente de troca de calor em contracorrente entre a artéria testicular e o plexo
52 pampiniforme (GLAD SØRENSEN; LAMBRECHTSEN; EINER-JENSEN, 1991).
53 Em condições ambientais adversas, a eficiência desse sistema pode ser
54 insuficiente, levando à hipertermia testicular e ao comprometimento progressivo
55 da produção e qualidade espermática (KASTELIC, 2014; KASTELIC; RIZZOTO;
56 THUNDATHIL, 2018).

57 Os efeitos do calor sobre a espermatogênese apresentam dinâmica
58 temporal particular. Alterações observadas no ejaculado frequentemente
59 refletem eventos ocorridos semanas antes no interior do testículo, dependendo
60 do estágio celular exposto durante o insulto (AMANN, 1983). Nesse processo, o
61 estresse oxidativo figura como mecanismo central: o aumento de espécies
62 reativas de oxigênio pode desencadear peroxidação lipídica, disfunção
63 mitocondrial e lesões em membranas (DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL;
64 ONG, 2015), dano acrossomal e fragmentação do DNA espermático (RAHMAN
65 et al., 2014; RAHMAN et al., 2018), além de ativar vias apoptóticas no tecido
66 testicular (HIKIM et al., 2003). Tais alterações podem reduzir motilidade,

67 viabilidade e integridade genômica, impactando diretamente o potencial
68 fertilizante do sêmen (MORRELL, 2020; RIZZOTO et al., 2020).

69 Tradicionalmente, a avaliação da fertilidade masculina baseou-se em
70 parâmetros seminais clássicos (motilidade, morfologia e concentração)
71 (GRAHAM; MOCÉ, 2005). Contudo, evidências acumuladas indicam que parte
72 do efeito do estresse térmico pode ser subclínica: mesmo na ausência de
73 alterações marcantes no espermograma, modificações moleculares no
74 espermatozoide podem comprometer eventos pós-fertilização (RAHMAN et al.,
75 2014; RAHMAN et al., 2018). Durante a fecundação, o espermatozoide contribui
76 para o embrião não apenas com DNA, mas também com proteínas, RNAs e
77 marcas epigenéticas que participam da reorganização do genoma e da
78 regulação das primeiras clivagens (GILBERT et al., 2007). Assim, alterações
79 induzidas pelo calor durante a espermatogênese e/ou maturação epididimária
80 podem repercutir na competência embrionária, reduzindo taxas de clivagem e
81 blastocisto e afetando qualidade e velocidade de desenvolvimento embrionário
82 (Siqueira et al., 2018), especialmente em sistemas de PIVE, que permitem isolar
83 a contribuição paterna em condições controladas (LLAMAS LUCEÑO et al.,
84 2020).

85 Outro aspecto decisivo é o papel do componente genético. *Bos indicus*
86 e *Bos taurus* diferem quanto à termotolerância e à resposta reprodutiva ao calor
87 (HANSEN, 2004). Em geral, os zebuínos apresentam maior capacidade de
88 dissipação térmica e maior resiliência reprodutiva (BRITO et al., 2004; BRITO et
89 al., 2012), enquanto os taurinos têm maior sensibilidade à elevação da
90 temperatura testicular (NICHI et al., 2006). Entretanto, há variabilidade individual
91 e intra-raça, sugerindo que a termotolerância é um fenótipo complexo,
92 influenciado por arquitetura genética e mecanismos moleculares ainda não
93 completamente elucidados (LEES et al., 2019; LEITE et al., 2021; WORKU et al.,
94 2023).

95 Apesar de avanços relevantes, persistem lacunas quanto aos
96 mecanismos pelos quais o estresse térmico masculino afeta a competência
97 embrionária, especialmente quando se busca integrar comparações entre
98 grupos genéticos distintos, medidas fisiológicas/funcionais e desfechos
99 embrionários em PIVE (LLAMAS LUCEÑO et al., 2020; WORKU et al., 2023); e

100 assinaturas moleculares do espermatozoide e/ou do embrião detectáveis por
101 abordagens ômicas (por exemplo, proteômica), capazes de explicar efeitos que
102 escapam às métricas seminais convencionais (CELEGHINI et al., 2024;
103 CHITKARA et al., 2025). Preencher essas lacunas é crucial para ampliar a
104 eficiência de biotecnologias reprodutivas, orientar estratégias de manejo em
105 períodos de maior carga térmica e subsidiar programas de seleção para
106 resiliência ao calor, tudo isso em um contexto de aquecimento global que tende
107 a intensificar desafios térmicos nos sistemas pecuários (FAO, 2019).

108

109 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

110 **2.1 Estresse térmico em bovinos**

111 A pecuária bovina constitui uma das principais bases da produção de
112 proteína animal em escala global, sendo altamente dependente do equilíbrio
113 fisiológico dos animais frente às condições ambientais. Entre os fatores
114 ambientais que impactam diretamente o desempenho produtivo e reprodutivo
115 dos bovinos, o estresse térmico destaca-se como um dos mais relevantes,
116 especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde temperaturas elevadas
117 e alta umidade relativa do ar são frequentes (KADZERE et al., 2002; WEST,
118 2003).

119 Em condições de conforto térmico, também chamadas de zona
120 termoneutra, os animais mantêm a homeotermia com menor custo energético,
121 pois os mecanismos de dissipação e produção de calor permanecem em
122 equilíbrio. Entretanto, quando a carga térmica ambiental ultrapassa a capacidade
123 de dissipação de calor do animal, situação frequente em ambientes com
124 temperatura elevada, alta umidade, intensa radiação solar e ventilação
125 insuficiente, ocorre sobrecarga progressiva dos mecanismos termorregulatórios,
126 com consequente perda de estabilidade homeostática, configurando o estresse
127 térmico (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017).

128 Do ponto de vista fisiológico, o estresse térmico consiste em uma série
129 de respostas sistêmicas destinadas a aumentar a dissipação do excesso de calor
130 corporal, que envolvem o aumento da sudorese, da frequência respiratória, da
131 ingestão de água e alterações no comportamento alimentar. Paralelamente,
132 observa-se redistribuição do fluxo sanguíneo corporal, priorizando tecidos

133 periféricos em detrimento de órgãos internos, além de alterações hormonais e
134 metabólicas que impactam diretamente a eficiência reprodutiva (FERNANDEZ-
135 NOVO et al., 2020; WEST, 2003). Em sistemas intensivos, como os
136 confinamentos, estratégias comportamentais, como a busca por sombra e ajuste
137 de padrão e do horário de pastejo, podem ser insuficientes para compensar os
138 efeitos do microclima e da densidade animal, ampliando o risco de perdas
139 produtivas e comprometimento do bem-estar (GRANDIN, 2016; MADER, 2014).

140 No contexto atual de mudanças climáticas, caracterizado pelo aumento
141 progressivo da temperatura média global e ocorrência mais frequentes de ondas
142 de calor, o estresse térmico é reconhecido como uma das principais ameaças à
143 eficiência e sustentabilidade da produção pecuária moderna. Incrementos
144 aparentemente modestos na temperatura ambiental podem resultar em perdas
145 expressivas de desempenho produtivo e reprodutivo, comprometendo a
146 eficiência dos sistemas (RUST, 2019; WEST, 2003, FAO, 2019).

147 A quantificação do desafio térmico em bovinos é frequentemente
148 realizada por meio do índice de temperatura e umidade (ITU), que integra
149 temperatura e umidade relativa do ar. Embora amplamente utilizado, o ITU
150 apresenta limitações importantes, pois não considera fatores como radiação
151 solar, velocidade do vento, sombreamento, isolamento térmico da pelagem e
152 diferenças individuais ou genéticas de adaptação fisiológica. Dessa forma, sua
153 utilização isolada pode subestimar o impacto real do estresse térmico,
154 especialmente em estudos voltados à reprodução, nos quais pequenas
155 variações térmicas podem gerar efeitos biológicos significativos (BOHMANOVA;
156 MISZTAL; COLE, 2007; BOVA et al., 2014; DIKMEN; HANSEN, 2009;
157 GAUGHAN et al., 2008). Assim, em estudos com desfechos fisiológicos e
158 reprodutivos, recomenda-se interpretar o ITU em conjunto com marcadores de
159 resposta do próprio animal, como frequência respiratória, ingestão, temperatura
160 corporal e ruminal, além de indicadores metabólicos, que refletem de maneira
161 mais direta o estado térmico e a capacidade individual de compensação
162 (FERNANDEZ-NOVO et al., 2020; LEMAL et al., 2023).

163 Quando persistente, o estresse térmico tende a induzir ajustes
164 sistêmicos com efeitos colaterais relevantes, como redução do consumo
165 alimentar e reorganização do metabolismo para reduzir termogênese e priorizar

manutenção. Além disso, há evidências de aumento de espécies reativas de oxigênio e risco de estresse oxidativo, com potencial dano a lipídios, proteínas e DNA em situações severas ou prolongadas, o que amplia a relevância do tema para a fertilidade e a competência embrionária (BERNABUCCI et al., 2002; MORRELL, 2020; RAHMAN et al., 2018; RIZZOTO et al., 2020).

171

172 **2.2 Diferenças entre *Bos taurus* e *Bos indicus* frente ao estresse térmico**

Diferenças fisiológicas, anatômicas e genéticas entre *B. taurus* e *B. indicus* exercem influência significativa sobre a resposta ao estresse térmico e sobre a eficiência reprodutiva em ambientes quentes. De modo geral, *B. indicus* apresentam maior termotolerância sistêmica e reprodutiva quando comparados a *B. taurus*, resultado de adaptações morfofisiológicas que favorecem dissipação de calor corporal e melhor estabilidade do sistema reprodutivo sob calor (HANSEN, 2004). No nível testicular, touros *B. indicus* apresentam, em média, características associadas a melhor controle térmico escroto testicular e manutenção de qualidade seminal sob temperaturas elevadas, como particularidades de vascularização e características escrotais (BRITO et al., 2012; NICHI et al., 2006). Em contraste, touros *B. taurus* tendem a apresentar maior sensibilidade à elevação da temperatura testicular em ambientes quentes, com piora acentuada de indicadores de qualidade seminal (ex., aumento de defeitos espermáticos) durante períodos de maior carga térmica, quando comparados a touros *B. indicus*, reforçando a importância de considerar o grupo genético na interpretação de estudos reprodutivos e na formulação de estratégias de manejo voltadas à mitigação dos efeitos do calor (BRITO et al., 2004; LEES et al., 2019; LEITE et al., 2021; NICHI et al., 2006). Além disso, evidências recentes sugerem que a variabilidade individual e a arquitetura genética podem influenciar fortemente a termotolerância, indicando que estratégias de seleção e manejo devem considerar também diferenças intra-raciais (WORKU et al., 2023).

195

196 **2.3 Termorregulação testicular em touros**

A manutenção da fertilidade masculina em bovinos depende, de forma crítica, da capacidade do organismo em preservar a temperatura testicular

199 inferior à temperatura corporal. A espermatogênese é um processo altamente
200 termossensível, exigindo que os testículos operem em temperaturas
201 aproximadamente entre 3 e 6 °C abaixo da temperatura corporal. Elevações
202 térmicas discretas, mesmo quando transitórias, são suficientes para
203 comprometer a produção espermática, a integridade celular e a funcionalidade
204 dos espermatozoides (KASTELIC; RIZZOTO; THUNDATHIL, 2018;
205 TAKAHASHI, 2012; WAITES, 1991; MOGOLLÓN-GARCÍA et al., 2026).

206 A temperatura testicular resulta do balanço dinâmico entre o ganho de
207 calor, proveniente principalmente do sangue arterial e do metabolismo tecidual,
208 e a dissipação térmica, mediada por um conjunto integrado de mecanismos
209 anatômicos e fisiológicos localizados no escroto e no cordão espermático. Esses
210 mecanismos atuam de forma coordenada e adaptativa, permitindo ajustes
211 contínuos frente às variações ambientais e comportamentais (Kastelic; Byrne
212 Cook; Coulter, 1997).

213

214 **2.3.1 Sistema anatômico-funcional de termorregulação testicular**

215 O sistema de termorregulação testicular é sustentado por um conjunto
216 integrado de estruturas anatômicas e mecanismos fisiológicos que atuam de
217 forma coordenada para manter a temperatura testicular abaixo da temperatura
218 corporal central, condição indispensável à espermatogênese.

219 O escroto constitui o componente mais externo desse sistema e
220 apresenta características morfológicas altamente especializadas para a
221 dissipação de calor. Sua pele é relativamente fina, com baixa deposição de
222 gordura subcutânea e elevada densidade de glândulas sudoríparas, o que
223 potencializa a perda de calor por condução, convecção e evaporação. A intensa
224 vascularização superficial contribui adicionalmente para a transferência de calor
225 entre o escroto e o ambiente externo (KASTELIC, 2014; SETCHELL, 2006). A
226 regulação da posição testicular é realizada pela túnica dartos, que promove
227 ajustes finos na área de superfície exposta por meio de contração ou
228 relaxamento da parede escrotal, e pelo músculo cremaster, localizado no
229 funículo espermático, responsável pela elevação ou abaixamento dos testículos
230 em relação ao corpo. Esses ajustes são fundamentais para otimizar a dissipação
231 térmica em ambientes quentes e limitar a perda excessiva de calor em ambientes

232 frios (KASTELIC; BYRNE COOK; COULTER, 1997; KASTELIC et al., 2021;
233 SETCHELL, 2006).

234 No interior do funículo espermático, o mecanismo de troca de calor em
235 contracorrente representa um dos componentes mais eficientes do sistema
236 termorregulatório. A artéria testicular percorre um trajeto longo e altamente
237 enovelado em íntima associação com o plexo pampiniforme, rede venosa
238 responsável pela drenagem do sangue testicular. Essa disposição anatômica
239 permite a transferência eficiente de calor do sangue arterial mais quente para o
240 sangue venoso mais frio, reduzindo significativamente a temperatura do sangue
241 arterial antes de sua chegada ao parênquima testicular (GLAD SØRENSEN;
242 LAMBRECHTSEN; EINER-JENSEN, 1991; KASTELIC; RIZZOTO;
243 THUNDATHIL, 2018). Estudos experimentais demonstraram que a eficiência
244 desse sistema no cordão espermático bovino pode superar 90%, evidenciando
245 sua elevada capacidade de pré-resfriamento arterial mesmo sob condições
246 ambientais desafiadoras (GLAD SØRENSEN; LAMBRECHTSEN; EINER-
247 JENSEN, 1991).

248 Ao conjunto formado pela artéria testicular e pelo plexo pampiniforme
249 denomina-se cone vascular testicular. Sua avaliação deve considerar a
250 disposição tridimensional das estruturas vasculares no funículo espermático,
251 uma vez que a geometria, o comprimento e o grau de proximidade entre os vasos
252 influenciam diretamente a capacidade termorregulatória. Touros com cone
253 vascular mais desenvolvido caracterizado por maior enovelamento arterial e
254 menor distância entre os vasos arteriais e venosos tendem a apresentar melhor
255 controle térmico testicular e maior produção espermática, especialmente em
256 situações de estresse térmico ambiental (BRITO et al., 2012; KASTELIC;
257 RIZZOTO; THUNDATHIL, 2018).

258

259 **2.3.2 Gradientes térmicos escrotais e testiculares**

260 A distribuição térmica no escroto e nos testículos não é homogênea,
261 seguindo gradientes fisiológicos bem estabelecidos. Em touros, a superfície
262 escrotal apresenta temperaturas mais elevadas na região proximal e
263 progressivamente menores em direção ao ápice. No interior do testículo, a
264 temperatura é relativamente uniforme, enquanto no epidídimo observa-se um

265 gradiente decrescente da cabeça para a cauda, favorecendo a maturação e o
266 armazenamento espermático (KASTELIC; COULTER; COOK, 1995).

267 A preservação desses gradientes térmicos é considerada essencial para
268 a função reprodutiva. A termografia infravermelha tem sido utilizada como
269 ferramenta não invasiva para a avaliação do gradiente térmico escrotal e,
270 consequentemente, testicular em touros. Em animais clinicamente normais, a
271 termografia revela padrões térmicos relativamente constantes e simétricos, com
272 gradiente típico da base para o ápice escrotal. Alterações na simetria térmica
273 entre os testículos ou na magnitude dos gradientes escrotais podem indicar
274 falhas na termorregulação e estão frequentemente associadas a processos
275 inflamatórios, degenerativos ou a comprometimento da eficiência reprodutiva
276 (PUROHIT et al., 1985).

277 Apesar de seu potencial, a interpretação de imagens termográficas
278 requer rigorosa padronização experimental, incluindo controle de fatores como
279 horário de avaliação, conhecimento de deitamento prévio, umidade escrotal,
280 radiação solar e condições ambientais. A ausência desse controle pode resultar
281 em leituras equivocadas e interpretações errôneas sobre a real condição térmica
282 testicular (KASTELIC et al., 1996).

283 Em síntese, a termorregulação testicular em touros é um processo
284 multicomponente, sustentado pela integração entre características anatômicas
285 do escroto, musculatura especializada, sistema vascular testicular e
286 mecanismos de troca de calor em contracorrente. A eficiência desse sistema é
287 determinante para a manutenção da espermatogênese e para a preservação da
288 fertilidade masculina, especialmente em ambientes caracterizados por elevada
289 carga térmica.

290

291 **2.4 Ciclo espermatogênico em bovinos**

292 Em bovinos, o ciclo espermatogênico apresenta duração aproximada de
293 61 dias, sendo tradicionalmente dividido em três fases principais:
294 espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. Durante a
295 espermatocitogênese, espermatogônias sofrem sucessivas divisões mitóticas;
296 na fase meiótica, espermatócitos primários originam células haploides; e, por fim,
297 na espermiogênese, espermátides diferenciam-se em espermatozoides

maduros, adquirindo morfologia e funcionalidade específicas (AMANN, 1983). A elevada taxa de proliferação celular e a intensa atividade metabólica associadas a essas etapas tornam as células germinativas particularmente vulneráveis a insultos térmicos. Assim, alterações na temperatura testicular podem interferir em diferentes fases do ciclo, resultando em padrões distintos de danos espermáticos detectáveis no ejaculado em momentos subsequentes. A espermatogênese é um processo altamente organizado e dependente de condições fisiológicas, particularmente no que se refere à temperatura testicular. Apesar da existência de mecanismos especializados de termorregulação, exposições agudas ou crônicas a temperaturas elevadas podem exceder a capacidade adaptativa do sistema escroto-testicular, resultando em elevação da temperatura intratesticular e comprometimento progressivo da produção e da qualidade dos espermatozoides (LLAMAS LUCEÑO et al., 2020; PAUL et al., 2008).

312

313

314 **2.5 Cronologia dos danos induzidos pelo estresse térmico**

A hipertermia testicular pode ocorrer por exposição ambiental com alto ITU ou por modelos experimentais controlados, como insulação escrotal e aquecimento testicular, os quais permitem padronizar intensidade e duração do insulto. Esses delineamentos são especialmente relevantes para interpretação de resultados, pois os defeitos espermáticos observados no ejaculado refletem eventos ocorridos semanas antes no interior do testículo, conforme o estágio celular afetado no momento do estresse (AMANN, 1983; RAHMAN et al., 2018). Estudos com abordagem cronológica têm descrito padrões de dano e recuperação ao longo das semanas subsequentes ao insulto, incluindo caracterização seriada de defeitos espermáticos morfofuncionais e retorno progressivo em janela próxima a um ciclo espermatogênico completo, embora sequelas possam persistir (GARCIA-OLIVEROS et al., 2020, 2022; RIZZOTO et al., 2019).

Essa defasagem temporal é um aspecto central para a interpretação de estudos reprodutivos em bovinos, uma vez que alterações na morfologia e na qualidade espermática podem surgir dias a semanas após o insulto térmico e

refletir eventos ocorridos previamente no interior do testículo e/ou durante a maturação epididimária (BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007; KASTELIC et al., 1996; MORRELL, 2020). Nos primeiros dias após a exposição térmica, os espermatozoides armazenados no epidídimo tendem a apresentar alterações discretas, como redução do potencial mitocondrial e comprometimento inicial da integridade acrosomal (MOGOLLÓN-GARCÍA et al., 2026). A partir de aproximadamente 14 dias, período correspondente à liberação de espermatozoides que se encontravam em fases finais de espermiogênese durante o insulto térmico, observam-se reduções mais evidentes na motilidade progressiva e aumento de defeitos morfológicos maiores. Entre 21 e 42 dias pós-exposição, quando células germinativas em meiose e espermatocitogênese foram afetadas, ocorre pico de alterações estruturais e funcionais, incluindo aumento da fragmentação do DNA espermático (RAHMAN et al., 2018; RIZZOTO et al., 2019). Em delineamentos com caracterização seriada pós-estresse, também se descrevem fases de piora e recuperação, coerentes com a passagem de diferentes cortes celulares pelo ciclo espermatogênico e pela maturação epididimária (GARCIA-OLIVEROS et al., 2022).

Adicionalmente, discussões mecanísticas atuais indicam que a hipertermia em si constitui fator central de interrupção da espermatogênese, e não apenas hipóxia local, uma vez que alterações seminais podem persistir mesmo quando hipóxia não explica os achados. Embora haja respostas compensatórias, como aumento de fluxo sanguíneo testicular durante aquecimento, esse ajuste frequentemente é insuficiente para preservar a integridade do processo espermatogênico (KASTELIC et al., 2017; RIZZOTO et al., 2019).

355

356 **2.6 Estresse oxidativo, integridade genômica e apoptose**

Entre os principais mecanismos envolvidos nos efeitos deletérios do estresse térmico sobre a espermatogênese destaca-se o estresse oxidativo. A elevação da temperatura testicular promove aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos túbulos seminíferos e no epidídimo, resultando em desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes e favorecendo danos celulares (MORRELL, 2020; RAHMAN et al., 2018). Os espermatozoides são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo em função da elevada proporção

364 de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas e da dependência
365 funcional da integridade mitocondrial para manutenção da motilidade. A
366 peroxidação lipídica compromete a fluidez das membranas, altera a
367 funcionalidade do acrossomo e reduz o potencial mitocondrial, culminando em
368 prejuízos à motilidade progressiva, viabilidade e capacidade fertilizante (Rahman
369 et al., 2018).

370 O acúmulo de ROS amplifica progressivamente os danos celulares,
371 atingindo o material genético do espermatozoide. A fragmentação do DNA
372 espermático e as alterações na compactação da cromatina constituem
373 consequências relevantes da hipertermia testicular, frequentemente associadas
374 a falhas na protaminação durante a espermiogênese (MORRELL, 2020;
375 RAHMAN et al., 2014). Essas alterações tornam o material genético paterno
376 mais suscetível a novos danos oxidativos e a falhas nos mecanismos de reparo,
377 com implicações diretas para a fertilização e para o desenvolvimento
378 embrionário inicial. Evidências indicam que espermatozoides com DNA
379 fragmentado podem fertilizar o oócito, porém resultam em embriões com menor
380 competência de desenvolvimento e maior probabilidade de perdas embrionárias
381 precoces (RAHMAN et al., 2014).

382 Quando o desequilíbrio oxidativo e o dano ao DNA ultrapassam os
383 limiares de reparo celular, vias apoptóticas são ativadas no tecido testicular.
384 Esse processo ocorre predominantemente pela via intrínseca, mediada por
385 alterações no balanço entre proteínas pró- e antiapoptóticas da família Bcl-2,
386 culminando na liberação de citocromo c e na ativação de caspases efetoras. A
387 via dependente de p53 tem sido apontada como mecanismo central na resposta
388 das células germinativas ao dano térmico, regulando a decisão celular entre
389 reparo e morte (RIZZOTO et al., 2020; HIKIM et al., 2003). A ativação dessas
390 vias contribui para a eliminação de células germinativas gravemente danificadas;
391 contudo, quando insuficiente, pode permitir a liberação de espermatozoides com
392 alterações subclínicas, capazes de comprometer a qualidade seminal e os
393 eventos pós-fertilização (DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL; Ong, 2015).

394

395 **2.7 Impactos do estresse térmico masculino no desenvolvimento** 396 **embrionário**

397 A eficiência do desenvolvimento embrionário inicial é fortemente
398 influenciada pela qualidade dos gametas envolvidos no processo de fertilização.
399 Embora tradicionalmente o foco das avaliações reprodutivas tenha sido
400 direcionado aos parâmetros espermáticos convencionais, evidências indicam
401 que alterações moleculares subclínicas no espermatozoide podem exercer
402 efeitos significativos sobre os eventos pós-fertilização, comprometendo a
403 competência embrionária mesmo na ausência de defeitos morfológicos
404 evidentes (LLAMAS LUCEÑO et al., 2020; RAHMAN et al., 2014). Do ponto de
405 vista funcional, esses efeitos têm sido evidenciados por alterações em
406 parâmetros como taxa de blastocisto, velocidade de desenvolvimento e
407 qualidade embrionária. Estudos envolvendo sazonalidade e exposição ao calor
408 durante a espermatogênese relatam redução da competência de fertilização *in*
409 *vitro* e prejuízos ao desenvolvimento embrionário, reforçando a influência do
410 ambiente térmico paterno sobre a competência do embrião (LLAMAS LUCEÑO
411 et al., 2020; VANSELOW et al., 2024).

412 Durante a fertilização, o espermatozoide contribui para o embrião não
413 apenas com o material genético paterno, mas também com uma série de
414 componentes moleculares essenciais, incluindo RNAs mensageiros, pequenos
415 RNAs não codificantes, proteínas e fatores epigenéticos que participam
416 ativamente da reorganização do genoma embrionário nas primeiras clivagens.
417 Dessa forma, alterações adquiridas durante a espermatogênese ou a maturação
418 epididimária podem repercutir diretamente na capacidade de desenvolvimento
419 do embrião (GILBERT et al., 2007; RAHMAN et al., 2018). O estresse térmico
420 testicular tem sido associado a modificações no conteúdo molecular do
421 espermatozoide, incluindo alterações em componentes associados à cromatina
422 e fatores envolvidos na proteção do DNA, com potencial para interferir em
423 processos críticos da embriogênese inicial, como ativação do genoma
424 embrionário, progressão das clivagens e formação do blastocisto (RAHMAN et
425 al., 2014). Em consonância com esse cenário, abordagens ômicas vêm
426 ampliando a capacidade de identificar vias e assinaturas associadas ao estresse
427 térmico e à fertilidade, apoiando estratégias de seleção e manejo em ambientes
428 quentes. Essa perspectiva é particularmente relevante quando se considera que
429 parte dos efeitos do calor pode não ser plenamente capturada por métricas

seminais clássicas, mas se manifestar como perturbações em processos regulatórios e metabólicos que repercutem no desenvolvimento embrionário (CELEGHINI et al., 2024; CHITKARA et al., 2025).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) constitui uma ferramenta experimental sensível para avaliar os efeitos do estresse térmico masculino sobre a competência embrionária. Em sistemas de PIVE, nos quais as condições ambientais e nutricionais são rigorosamente controladas, torna-se possível isolar a contribuição paterna para o desenvolvimento embrionário, minimizando a influência de fatores maternos e de manejo. Além disso, a qualidade do sêmen responde por parcela relevante da variabilidade observada nas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário, reforçando a importância de avaliações sensíveis e integrativas em estudos de fertilidade (GRAHAM; MOCÉ, 2005; SIQUEIRA et al., 2018).

Estudos em bovinos demonstram que o uso de sêmen oriundo de touros expostos ao estresse térmico está associado à redução das taxas de clivagem e de blastocisto, bem como a atrasos no desenvolvimento embrionário *in vitro* (LLAMAS LUCEÑO et al., 2020). Esses achados sustentam a interpretação de que o dano pode ultrapassar o detectável no espermograma e envolver integridade genômica/epigenética e alterações no conteúdo molecular do gameta, capazes de interferir em eventos pós-fertilização (RAHMAN et al., 2014, 2018).

Um dos principais mecanismos propostos para explicar os efeitos do estresse térmico masculino sobre o desenvolvimento embrionário envolve alterações epigenéticas no espermatozoide. Evidências indicam que a hipertermia testicular pode interferir nos processos de protaminação da cromatina espermática, resultando em persistência anormal de histonas e maior suscetibilidade do DNA paterno a danos oxidativos (RAHMAN et al., 2014). Falhas nos processos de reprogramação epigenética pós-fertilização têm sido descritas em embriões originados de sêmen submetido ao estresse térmico, incluindo alterações na dinâmica de desmetilação do genoma paterno e efeitos em etapas subsequentes do desenvolvimento (RAHMAN et al., 2014, 2018). Além disso, o estresse térmico pode alterar o perfil de pequenos RNAs não codificantes, como microRNAs, presentes no espermatozoide, com possíveis

463 repercussões na regulação gênica embrionária e em vias ligadas a estresse,
464 metabolismo e apoptose (CELEGHINI et al., 2024; RAHMAN et al., 2018).

465

466 **2.8 Lacunas de conhecimento e implicações para a pesquisa reprodutiva**

467 Apesar dos avanços no entendimento dos efeitos do estresse térmico
468 masculino sobre a fertilidade e o desenvolvimento embrionário, persistem
469 lacunas importantes na literatura. A maioria dos estudos concentra-se em raças
470 taurinas e em avaliações pontuais de expressão gênica embrionária, havendo
471 escassez de dados integrando abordagens ômicas e comparações entre grupos
472 genéticos distintos. Nesse contexto, a investigação dos efeitos do estresse
473 térmico masculino sobre parâmetros embrionários em diferentes genótipos
474 bovinos, bem como a identificação de assinaturas moleculares associadas à
475 competência de desenvolvimento, torna-se particularmente relevante. Esses
476 aspectos fundamentam o delineamento experimental do presente estudo e
477 reforçam a importância de abordagens integrativas para compreender os
478 mecanismos pelos quais o ambiente térmico paterno influencia o sucesso
479 reprodutivo (CELEGHINI et al., 2024; CHITKARA et al., 2025)

480

481 **3. Considerações finais**

482 Em conjunto, a literatura evidencia que o estresse térmico compromete
483 a fertilidade masculina em bovinos por meio de múltiplos mecanismos
484 integrados, envolvendo falhas na termorregulação testicular, danos celulares e
485 moleculares à espermatogênese, alterações na qualidade espermática e
486 prejuízos funcionais detectáveis no desenvolvimento embrionário. Diferenças
487 entre grupos genéticos, especialmente entre *B. taurus* e *B. indicus*, modulam a
488 intensidade desses efeitos, reforçando a necessidade de abordagens
489 experimentais e estratégias de manejo adaptadas às condições ambientais e ao
490 perfil genético dos animais. Esse conjunto de evidências fundamenta o
491 delineamento experimental adotado no presente estudo e justifica a investigação
492 dos efeitos do estresse térmico masculino sobre parâmetros embrionários, com
493 ênfase na identificação de assinaturas moleculares associadas à competência
494 de desenvolvimento, contribuindo para o avanço do conhecimento em

495 biotecnologia reprodutiva bovina frente aos desafios impostos pelas mudanças
496 climáticas.

497

498 **4. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

499 **4.1. Hipóteses**

500 O estresse térmico testicular induz alterações celulares e moleculares
501 nos espermatozoides de touros, comprometendo sua competência fertilizante e
502 modificando o perfil proteico dos embriões produzidos *in vitro*. Esses efeitos
503 ocorrem de maneira distinta entre bovinos *B. taurus* e *B. indicus*, sendo esperada
504 maior sensibilidade dos taurinos e maior resistência dos zebuínos ao insulto
505 térmico.

506

507 **4.2. Objetivo geral**

508 Investigar os efeitos do estresse térmico testicular sobre a competência
509 espermática e sobre o perfil proteico de embriões bovinos produzidos *in vitro*,
510 avaliando separadamente touros *B. taurus* e *B. indicus*.

511

512 **4.3. Objetivos específicos**

513 Avaliar o impacto do estresse térmico testicular sobre os parâmetros
514 espermáticos de touros taurinos e zebuínos, em diferentes momentos após o
515 insulto térmico.

516 Avaliar a taxa de produção, e o desenvolvimento embrionária do sêmen
517 de touros *B. taurus* e *B. indicus* criopreservados em diferentes momentos após
518 à insulação escrotal.

519 Caracterizar o perfil proteico de embriões bovinos *in vitro* e identificar
520 proteínas diferencialmente abundantes com análise funcional por ontologia
521 gênica.

522

523

524

525

526

527

528

529 **REFERÊNCIAS**

530 AMANN, R. P. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in

531 Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2606–2622, dez. 1983.532 BERNABUCCI, U. *et al.* Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes533 of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.

534 9, p. 2173–2179, set. 2002.

535 BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-Humidity Indices as

536 Indicators of Milk Production Losses due to Heat Stress. **Journal of Dairy**537 **Science**, v. 90, n. 4, p. 1947–1956, 1 abr. 2007.538 BOVA, Torea L. *et al.* Environmental stressors influencing hormones and539 systems physiology in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12,

540 n. 1, p. 58, 4 jul. 2014.

541 BRITO, Leonardo F. C. *et al.* Testicular thermoregulation in *Bos indicus*,542 crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone

543 and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production.

544 **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 511–528, 15 jan. 2004.545 BRITO, Leonardo F. C. *et al.* Testicular vascular cone development and its

546 association with scrotal temperature, semen quality, and sperm production in

547 beef bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 3–4, p. 135–140, out. 2012.548 CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho *et al.* Bovine testicular heat stress: From549 climate change to effects on microRNA profile. **Animal Reproduction Science**,

550 v. 270, p. 107620, 1 nov. 2024.

551 CHITKARA, Meenakshi *et al.* Omics approaches to understand impact of heat552 stress on semen quality and fertility in bovines. **Animal Reproduction Science**,

553 v. 274, p. 107786, 1 mar. 2025.

554 COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100-Year Review: Stress

555 physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p.

556 10367–10380, dez. 2017.

- 557 DIKMEN, S.; HANSEN, P. J. Is the temperature-humidity index the best indicator
558 of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **Journal of**
559 **Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 109–116, jan. 2009.
- 560 DURAIRAJANAYAGAM, Damayanthi; AGARWAL, Ashok; ONG, Chloe. Causes,
561 effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive**
562 **Biomedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 14–27, jan. 2015.
- 563 FERNANDEZ-NOVO, Aitor *et al.* The Effect of Stress on Reproduction and
564 Reproductive Technologies in Beef Cattle A Review. **Animals**, v. 10, n. 11, 10
565 nov. 2020.
- 566 GARCIA-OLIVEROS, Laura Nataly *et al.* Heat stress effects on bovine sperm
567 cells: a chronological approach to early findings. **International Journal of**
568 **Biometeorology**, v. 64, n. 8, p. 1367–1378, ago. 2020.
- 569 GARCIA-OLIVEROS, Laura Nataly *et al.* Chronological characterization of sperm
570 morpho-functional damage and recovery after testicular heat stress in Nellore
571 bulls. **Journal of Thermal Biology**, v. 106, p. 103237, maio 2022.
- 572 GAUGHAN, J. B. *et al.* A new heat load index for feedlot cattle. **Journal of**
573 **Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 226–234, jan. 2008.
- 574 GILBERT, Isabelle *et al.* A molecular analysis of the population of mRNA in
575 bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1073–1086, jun. 2007.
- 576 GLAD SØRENSEN, H.; LAMBRECHTSEN, J.; EINER-JENSEN, N. Efficiency of
577 the countercurrent transfer of heat and ¹³³Xenon between the pampiniform
578 plexus and testicular artery of the bull under in-vitro conditions. **International**
579 **Journal of Andrology**, v. 14, n. 3, p. 232–240, jun. 1991.
- 580 GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen.
581 **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492–504, ago. 2005.
- 582 GRANDIN, Temple. Evaluation of the welfare of cattle housed in outdoor feedlot
583 pens. **Veterinary and Animal Science**, v. 1–2, p. 23–28, 1 dez. 2016.
- 584 HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal
585 stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 349–360, jul. 2004.
- 586 HIKIM, Amiya P. Sinha *et al.* Key apoptotic pathways for heat-induced
587 programmed germ cell death in the testis. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3167–
588 3175, jul. 2003.

- 589 KADZERE, C. T. *et al.* Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock**
590 **Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59–91, out. 2002.
- 591 KASTELIC, J. P. *et al.* Environmental factors affecting measurement of bovine
592 scrotal surface temperature with infrared thermography. **Animal Reproduction**
593 **Science**, v. 41, n. 3, p. 153–159, 1 mar. 1996.
- 594 KASTELIC, J. P. *et al.* Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility
595 and morphology following testicular hyperthermia. **Veterinární Medicína**, v. 62,
596 n. 8, p. 437–442, 31 ago. 2017.
- 597 KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H.; COOK, R. B. Scrotal surface, subcutaneous,
598 intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology**, v. 44,
599 n. 1, p. 147–152, 1 jul. 1995.
- 600 KASTELIC, J. P.; RIZZOTO, G.; THUNDATHIL, J. Review: Testicular vascular
601 cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen
602 quality and sperm production in bulls. **Animal**, v. 12, p. s133–s141, 1 jan. 2018.
- 603 KASTELIC, John P. Understanding and evaluating bovine testes.
604 **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 18–23, 1 jan. 2014.
- 605 KASTELIC, John P.; BYRNE COOK, R.; COULTER, Glenn H. Scrotal/Testicular
606 Thermoregulation and the Effects of Increased Testicular Temperature in the
607 Bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2,
608 p. 271–282, 1 jul. 1997.
- 609 KASTELIC, John Patrick *et al.* Pathogenesis and mitigation of the deleterious
610 effects of heat stress on bull reproduction. **Revista Brasileira de Reprodução**
611 **Animal**, v. 45, n. 4, p. 518–524, 2021.
- 612 KATO, Yoku *et al.* ACRBP (Sp32) is involved in priming sperm for the acrosome
613 reaction and the binding of sperm to the zona pellucida in a porcine model. **PLOS**
614 **ONE**, v. 16, n. 6, p. e0251973, 4 jun. 2021.
- 615 LEES, Angela M. *et al.* The Impact of Heat Load on Cattle. **Animals**, v. 9, n. 6,
616 p. 322, 6 jun. 2019.
- 617 LEITE, Roberta Ferreira *et al.* Reproductive parameters of *Bos taurus* and *Bos*
618 *indicus* bulls during different seasons in tropical conditions: focus on an
619 alternative approach to testicular assessments using ultrasonography. **Animal**
620 **Reproduction Science**, v. 225, p. 106668, fev. 2021.

- 621 LEMAL, P. *et al.* *Invited review: From heat stress to disease Immune response*
 622 *and candidate genes involved in cattle thermotolerance. Journal of Dairy*
 623 **Science**, v. 106, n. 7, p. 4471–4488, 1 jul. 2023.
- 624 LLAMAS LUCEÑO, Núria *et al.* Exposing dairy bulls to high temperature-humidity
 625 index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development
 626 *in vitro. Theriogenology*, v. 141, p. 16–25, 1 jan. 2020.
- 627 MADER, T. L. BILL E. KUNKLE INTERDISCIPLINARY BEEF SYMPOSIUM:
 628 Animal welfare concerns for cattle exposed to adverse environmental conditions.
 629 **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 12, p. 5319–5324, 1 dez. 2014.
- 630 MORRELL, Jane M. Heat stress and bull fertility. **Theriogenology**, v. 153, p. 62–
 631 67, 1 set. 2020.
- 632 NICHI, M. *et al.* Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus*
 633 bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822–828,
 634 1 set. 2006.
- 635 SCF/ β -TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of
 636 the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner. **Molecular and**
 637 **Cellular Biology**, 20 mar. 2023.
- 638 PAUL, Catriona *et al.* A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA
 639 damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**,
 640 v. 136, n. 1, p. 73–84, 1 jul. 2008.
- 641 RAHMAN, Mohammad Bozlur *et al.* Altered chromatin condensation of heat-
 642 stressed spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming
 643 in the paternal genome after *in vitro* fertilisation in cattle. **Reproduction, Fertility,**
 644 **and Development**, v. 26, n. 8, p. 1107–1116, out. 2014.
- 645 RAHMAN, Mohammad Bozlur *et al.* Heat stress responses in spermatozoa:
 646 Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**, v. 113, p.
 647 102–112, jun. 2018.
- 648 RIZZOTO, G. *et al.* Testicular hyperthermia increases blood flow that maintains
 649 aerobic metabolism in rams. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 31,
 650 n. 4, p. 683–688, abr. 2019.
- 651 RIZZOTO, G. *et al.* Short-term testicular warming under anesthesia causes
 652 similar increases in testicular blood flow in *Bos taurus* versus *Bos indicus* bulls,
 653 but no apparent hypoxia. **Theriogenology**, v. 145, p. 94–99, 15 mar. 2020.

- 654 RIZZOTO, G. *et al.* Acute mild heat stress alters gene expression in testes and
 655 reduces sperm quality in mice. **Theriogenology**, v. 158, p. 375–381, 1 dez. 2020.
- 656 RUST, Jean M. The impact of climate change on extensive and intensive
 657 livestock production systems. **Animal Frontiers: The Review Magazine of**
 658 **Animal Agriculture**, v. 9, n. 1, p. 20–25, jan. 2019.
- 659 SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. 2006.
- 660 SIQUEIRA, Adriano Felipe Perez *et al.* Sperm traits on *in vitro* production (IVP)
 661 of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. **PloS One**, v. 13,
 662 n. 7, p. e0200273, 2018.
- 663 SHEN, Peter S.; WILLARDSON, Barry M. Protein folding by the CCT/TRiC
 664 chaperone complex. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 91, p. 102999,
 665 1 abr. 2025.
- 666 TAKAHASHI, Masashi. Heat stress on reproductive function and fertility in
 667 mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 11, n. 1, p. 37–47, jan. 2012.
- 668 TUMOVA, Lucie *et al.* Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona
 669 Pellucida Interactions in Mammals. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 133, jan. 2021.
- 670 VANSELOW, Jens *et al.* summer heat during spermatogenesis reduces *in vitro*
 671 blastocyst rates and affects sperm quality of next generation bulls. **Andrology**,
 672 v. 12, n. 8, p. 1897–1906, nov. 2024.
- 673 WAITES, G. M. Thermoregulation of the scrotum and testis: studies in animals
 674 and significance for man. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.
 675 286, p. 9–17, 1991.
- 676 WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy**
 677 **Science**, v. 86, n. 6, p. 2131–2144, jun. 2003.
- 678 WORKU, Destaw *et al.* Candidate genes associated with heat stress and
 679 breeding strategies to relieve its effects in dairy cattle: a deeper insight into the
 680 genetic architecture and immune response to heat stress. **Frontiers in**
 681 **Veterinary Science**, v. 10, p. 1151241, 2023.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Impacto do Estresse Térmico Espermático sobre o Proteoma de Embriões Bovinos

Sperm Heat Stress Impact on the Proteome of Bovine Embryos

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

Autor correspondente:

*João Carlos Pinheiro Ferreira

Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/n, Botucatu, SP 18618–681, Brazil.

Tel: +55 14 38802121; Email: joao.cp.ferreira@unesp.br

Obs. Este capítulo foi redigido de acordo com as normas da revista *Animal Reproduction Science*, exceto pelo idioma empregado, que foi o português.

Resumo

O estresse térmico compromete a termorregulação testicular, a espermatogênese e consequentemente a fertilidade dos animais. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do estresse térmico sobre proteoma de embriões produzidos *in vitro* com o emprego de sêmen de touros Holandeses preto e branco (HPB; *Bos taurus*) e nelore (NEL; *Bos indicus*) submetidos a insulação escrotal por 48 horas. Quatro touros HPB e quatro touros NEL foram submetidos à insulação escrotal por 48 horas. Coletas seminais foram realizadas 5 dias antes do início da insulação escrotal (Dia -5 [D-5]), e subsequentemente em D7, D28, D49 e D63. As amostras foram analisadas por *Computer-Assisted Sperm Analysis* (CASA) e morfologia espermermática pré e pós criopreservação, foram empregadas na produção *in vitro* de embriões; os blastocistos obtidos foram submetidos à análise proteômica. A temperatura média da superfície escrotal durante a insulação não diferiu entre as raças. Em ambas, o estresse térmico reduziu a motilidade total, a motilidade progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos, além de aumentar os defeitos espermáticos no D28, com recuperação a partir de D49. A taxa de blastocisto não foi alterada no grupo Holandês, mas foi reduzida no Nelore quando utilizado sêmen criopreservado em D7 e D49. A análise proteômica identificou 357 proteínas nos embriões do grupo holandês e 385 no grupo Nelore. Dentre essas, foram identificadas 41 proteínas diferencialmente abundantes no grupo HPB e 18 no grupo NEL, com predomínio de alterações em D7H e D63N, respectivamente, evidenciando respostas temporais distintas entre as raças. Em conjunto, os resultados demonstram que o estresse térmico escrotal compromete transitoriamente a qualidade seminal e repercute sobre o desenvolvimento embrionário e o perfil proteômico dos embriões, com dinâmica de resposta dependente da raça.

Palavras-chave: insulação escrotal; qualidade espermática; desenvolvimento embrionário; proteômica embrionária; fertilidade paterna; proteômica; espermatozoide.

Highlights

- A insulação escrotal por 48 h comprometeu transitoriamente a qualidade espermática em touros Holandeses e Nelore.
- A motilidade espermática foi reduzida e os defeitos morfológicos aumentaram no D28, com a recuperação a partir de D49.
- A taxa de blastocisto foi reduzida apenas no grupo Nelore, nos momentos D7 e D49.
- O proteoma embrionário apresentou respostas temporais distintas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*.
- As alterações proteômicas foram mais precoces em Holandês (D7H) e mais tardias em Nelore (D63N).

1. Introdução

A termorregulação escrotal é essencial para a espermatogênese normal e para a fertilidade de machos bovinos (KASTELIC; BYRNE COOK; COULTER, 1997; KASTELIC; RIZZOTO; THUNDATHIL, 2018). Mesmo elevações transitórias da temperatura testicular podem comprometer o desenvolvimento das células germinativas, prejudicando a qualidade espermática e a capacidade fecundante (WAITES, 1991; TAKAHASHI, 2012). Como a espermatogênese é um processo altamente organizado e sensível à temperatura (AMANN, 1983), as consequências do estresse térmico testicular podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento das células germinativas expostas no momento do insulto (RIZZOTO et al., 2019; GARCIA-OLIVEROS et al., 2020, 2022).

Em touros, a injúria térmica testicular tem sido associada a alterações na motilidade, morfologia e viabilidade espermática, com potenciais efeitos negativos sobre o desempenho reprodutivo (RAHMAN et al., 2018; MORRELL, 2020). No entanto, o impacto do estresse térmico paterno pode ir além dos parâmetros seminais convencionais. Os espermatozoides contribuem para o zigoto não apenas com o genoma paterno, mas também com componentes moleculares capazes de influenciar o desenvolvimento embrionário inicial, como RNAs mensageiros, pequenos RNAs não codificantes, proteínas e fatores epigenéticos (GILBERT et al., 2007; RAHMAN et al., 2018). Dessa forma, alterações induzidas pelo calor na função espermática podem afetar a produção de embriões e o perfil molecular embrionário (RAHMAN et al., 2014; LLAMAS LUCEÑO et al., 2020), mesmo quando algumas características seminais aparentam recuperação parcial ao longo do tempo (GARCIA-OLIVEROS et al., 2022).

As diferenças raciais na tolerância ao calor também são relevantes na reprodução bovina. Bovinos *Bos indicus* são geralmente considerados mais adaptados a ambientes quentes, enquanto raças *Bos taurus* tendem a ser mais suscetíveis ao desafio térmico (HANSEN, 2004; BRITO et al., 2004; NICHI et al., 2006). Apesar dessa reconhecida diferença na adaptação ao calor, os efeitos temporais do estresse térmico testicular sobre a qualidade seminal e sobre a produção *in vitro* de embriões ainda não estão completamente esclarecidos,

especialmente em estudos comparativos entre esses dois grupos genéticos sob o mesmo modelo experimental (LEITE et al., 2021; LEES et al., 2019).

A insulação escrotal tem sido utilizada como modelo controlado para induzir estresse térmico testicular e investigar seus efeitos sobre a produção espermática (RAHMAN et al., 2018; RIZZOTO et al., 2019). Essa abordagem permite a avaliação do sêmen coletado em intervalos definidos após o insulto térmico, fornecendo informações sobre a susceptibilidade das diferentes fases da espermatogênese (GARCIA-OLIVEROS et al., 2020, 2022). Além disso, a associação entre análise seminal, produção *in vitro* de embriões e análise proteômica pode contribuir para elucidar se o estresse térmico paterno induz efeitos posteriores sobre a competência de desenvolvimento embrionário e sobre os padrões de abundância proteica dos embriões (CELEGHINI et al., 2024; CHITKARA et al., 2025; LLAMAS LUCEÑO et al., 2020).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos temporais da insulação escrotal por 48 horas sobre as características espermáticas de touros HPB (*B. taurus*) e NEL (*B. indicus*). Adicionalmente, buscou-se avaliar a taxa de produção *in vitro* e o proteoma de embriões bovinos produzidos com sêmen criopreservado de touros submetidos à insulação escrotal por 48 horas. A hipótese do estudo foi que o estresse térmico escrotal induz alterações dependentes do tempo na qualidade seminal e no desempenho embrionário, com respostas distintas entre as raças avaliadas.

2. Material e métodos

2.1 Aspectos éticos

O experimento foi conduzido na Fazenda Lageado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil (22° 51' 3,51" S, 48° 25' 25,77" W, altitude de 783 m). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESP – Câmpus de Botucatu, sob o protocolo nº 0222/2022.

2.2 Desenho Experimental

Oito touros, sendo quatro Nelore (NEL; *Bos indicus*) e quatro Holandês Preto e Branco (HPB; *Bos taurus*), com aproximadamente 18 meses de idade, escore de condição corporal $\geq 2,5$ (escala de 1 a 5 EDMONSON *et al.*, 1989), motilidade espermática $\geq 70\%$ e pelo menos 70% de espermatozoides com morfologia normal, foram selecionados para o estudo. Os animais permaneceram alojados em baias coletivas e receberam dieta composta por silagem e concentrado à base de milho, fornecida duas vezes ao dia, com acesso livre à água e suplemento mineral NRC que compreendem 17 elementos essenciais divididos entre macrominerais (cálcio, fósforo, sódio, cloro, potássio, magnésio e enxofre) e microminerais (ferro, zinco, cobre, manganês, selênio, iodo, cobalto, cromo, níquel e molibdênio). Após um período de adaptação de 14 dias, os touros, foram submetidos a 48 horas de insulação escrotal (IE), utilizando fraldas pediátricas descartáveis que envolveram completamente o escroto e o funículo espermático (RIZZOTO *et al.*, 2020b), sendo considerado dia zero (D0) o dia do início da insulação.

As coletas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação 5 dias antes do início da insulação escrotal (D-5; controle) e, posteriormente em D7, D28, D49 e D63. Esses intervalos foram estabelecidos para que, em cada coleta, fossem avaliados espermatozoides derivados de células germinativas que, no momento da indução do estresse térmico, encontravam-se em diferentes estágios do desenvolvimento espermatogênico. Assim, as coletas em D7, D28, D49 e D63 corresponderam, respectivamente, às células que estavam nas fases de maturação epididimária, espermiogênese, meiose e espermatocitogênese quando o insulto térmico foi aplicado. Inicialmente, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade por análise seminal computadorizada (Hamilton Thorne Motility Analyser). Em seguida, os ejaculados foram criopreservados segundo protocolo convencional e reavaliados após a descongelação (Papa *et al.*, 2015).

2.3 Insulação Escrotal e Análise Espermática

A insulação escrotal foi realizada durante a primavera, em dias distintos para cada raça, com intervalo de uma semana. Cinco dias antes da IE (D-5), os

touros foram submetidos à coleta seminal por eletroejaculação e o sêmen criopreservado. Durante a IE, a temperatura da superfície escrotal registrada continuamente por *dataloggers* posicionados no interior da câmara formada pela superfície interna das fraldas e pele escrotal.

2.4 Avaliação Seminal

Após as coletas, os ejaculados foram mantidos em tubos graduados a 35 °C em banho-maria e avaliados por meio do sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*, Hamilton-Thorne, versão 10 Ivos, HTR-IVOS 10 Analyzer, Beverly, MA, EUA). Foram determinados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), velocidade média do trajeto (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento da cauda (BCF). A calibração do equipamento seguiu o padrão bovino estabelecido pelo Centro de Reprodução Animal da FMVZ–Unesp (Diniz et al., 2020).

2.5 Criopreservação do Sêmen

Após a determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer, os ejaculados foram diluídos no meio BotuBov® (BotuPharma, Botucatu, Brasil) para atingir a concentração de 80×10^6 espermatozoides/mL, assegurando que cada palheta de 0,25 mL contivesse 20×10^6 células. A seguir, as palhetas permaneceram a 5 °C por quatro horas para estabilização térmica, sendo então transferidas para uma grade suspensa a 5 cm acima do nitrogênio líquido por 20 minutos antes da imersão e armazenamento em botijão criogênico.

2.6 Produção *In Vitro* de Embriões (PIV)

Para a PIV, foram empregadas amostras criopreservadas em D-5, D7, D49 e D63 de touros NEL (n = 13 repetições biológicas) e HPB (n = 10 repetições biológicas). As amostras do D28 não foram empregadas devido a sua reduzida motilidade total pós-descongelção (~1%).

Os ovários, provenientes de fêmeas predominantemente NEL, foram obtidos em abatedouro local e transportados em solução salina 0,9% (p/v) a 37 °C. Folículos de 2 a 8 mm foram aspirados com agulha 18G acoplada a seringa de 10 mL. O fluido folicular foi centrifugado e o pellet transferido para placas de Petri de 90 mm.

A seleção dos CCOs foi realizada sob estereomicroscopia (Nikon SMZ800, Tóquio, Japão), considerando apenas estruturas com citoplasma homogêneo e granulação fina, com múltiplas camadas compactas de células do cumulus (graus 1 e 2; STOJKOVIC et al., 2001).

Os CCOs selecionados foram lavados em meio tamponado (Oocyte Wash®, BotuPharma) e transferidos para placas de quatro poços (45–50 CCOs por poço), contendo 10 µL/CCO de meio de maturação (Oocyte IVM®, BotuPharma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, EUA). As placas foram incubadas a 38,5 °C, em atmosfera umidificada com 5,5% de CO₂ por 24 horas.

Após a maturação *in vitro* (MIV,) os CCOs foram lavados e transferidos para placas de Petri contendo gotas de 90 µL de meio de fertilização (Culture IVF®, BotuPharma), com até 25 CCOs por gota, cobertas com óleo de silicone (Oil®, BotuPharma).

As amostras de sêmen foram descongeladas a 37 °C por 30 s, reavaliadas pelo sistema CASA, e submetidas à seleção espermática em gradiente Select Sperm® (45% e 90%, v/v). Após centrifugação a 4500 × g por 5 min e lavagem em Sperm Wash® (BotuPharma), o *pellet* foi centrifugado novamente a 2000 × g por 3 min. A seguir, a concentração espermática foi ajustada para 1 × 10⁶ espermatozoides/mL, e os CCOs foram co-incubados com o sêmen por 18 h a 38,5 °C e 5,5% de CO₂.

Para o cultivo *in vitro* (CIV), os zigotos presumidos foram desnudados por pipetagem em Oocyte Wash® e cultivados em placas de quatro poços, utilizando 10 µL de meio Culture Embryo IVC 1® (BotuPharma) por zigoto, suplementado com 2,5% de soro fetal bovino.

As estruturas foram incubadas a 38,5 °C, sob atmosfera controlada (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂) por seis dias. Após quatro dias, foi realizada troca parcial

(50%) do meio IVC 1® por IVC 2® (BotuPharma). No sexto dia de cultivo, avaliou-se a taxa de blastocistos, classificando-se os embriões como não expandidos, expandidos ou eclodidos, conforme os critérios de Jakobsen (2006).

2.7 Proteômica

Para a proteômica, foram avaliados embriões produzidos em todos os momentos experimentais, considerando-se e de cada raça individualmente (*B. indicus* e *B. taurus*). Para cada combinação momento-raça, foram realizadas quatro réplicas, utilizando-se *pool* de dois embriões por réplica. Aos embriões, foram adicionados 200 µL de solução tampão RIPA modificada, conforme descrito por PEACH et al. (2012), contendo inibidores de protease (150 mmol de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% de desoxicolato de sódio, 0,1% de dodecil sulfato de sódio, 0,8 mmol de EDTA, 1,0 µg/mL de aprotinina, 1,0 µg/mL de leupeptina e 35,0 µg/mL de PMSF em 50 mmol de Tris-HCl, pH 7,2). Em seguida, as amostras foram sonicadas em banho de gelo (Baker et al.; 2002; Souza et al.; 2009). Após centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C.

Após a descongelação, o sobrenadante contendo as proteínas foi concentrado utilizando um ultrafiltro centrífugo (3 kDa cutoff, Amicon Ultra, Millipore Corporation, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a $14.000 \times g$, por 30 minutos, a 4°C. O volume original de cada amostra era cerca de 0,5 mL que foram concentrados até um volume aproximado de 20 µL.

A concentração de proteína total das amostras embrionárias foi determinada por absorvância A280 em nano-espectrômetro (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, São Paulo, Brasil). Uma alíquota contendo 1 µg de proteína total foi preparada para eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Após a migração inicial das amostras no gel de separação, a corrida eletroforética foi interrompida, e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 (Luo et al., 2006; Neuhoﬀ et al., 1985). Os fragmentos corados foram excisados e a digestão triptica dos peptídeos foi conduzida.

2.8 Digestão triptica

A digestão foi conduzida conforme o protocolo descrito por Shevchenko et al. (1996) com modificações (CARVALHO et al., 2021). Inicialmente, os fragmentos de gel foram descoloridos utilizando solução contendo 50% de metanol e 2,5% de ácido acético em água ultrapura, seguida de desidratação em acetonitrila a 100%. A redução das ligações dissulfeto foi realizada com ditioneitol (DTT) (Bio-Rad, Lagoa Santa, MG, Brasil), e a alquilação das cisteínas foi conduzida com iodoacetamida (Bio-Rad, Santo Amaro, MG, Brasil). Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão enzimática com tripsina (20 ng/ μ L), empregando uma razão enzima:substrato de 1:50 (m/m), incubadas *overnights*. Os peptídeos resultantes foram extraídos utilizando ácido fórmico a 5%, concentrados em sistema SpeedVac (SPD1010 Integrated SpeedVac Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e armazenados a -20 °C até a análise por espectrometria de massas para dessalinização, as amostras foram ressuspensas em 10 μ L TFA 0.1% (v:v) com auxílio do ZipTip. As amostras foram concentradas (SPD1010 Integrated SpeedVac Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e armazenadas a -80 °C, até a análise por espectrometria de massa.

2.9 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Os peptídeos foram analisados em um espectrômetro de massas Orbitrap Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um sistema de cromatografia líquida Evosep One por meio de uma fonte de ionização por nanoeletrospray, operando no modo de aquisição independente de dados (DIA). As amostras foram previamente concentradas em Evotips EV2001 C18 e separadas em uma coluna UHPLC IonOpticks Aurora Elite™ XT C18 (15 cm $\times$ 75 μ m; tamanho de partícula de 1,7 μ m), utilizando o método Evosep Whisper Zoom 20SPD (20 amostras por dia).

A tensão do nanoeletrospray foi mantida em 1,7 kV, e a temperatura da fonte foi ajustada para 275 °C. O Orbitrap Exploris 240 foi operado em modo MS completo com resolução de 120.000, varrendo uma faixa de razão massa/carga

(m/z) de 350 a 1400, com alvo de ganho automático (AGC) de 300% e tempo máximo de injeção de 45 ms. As aquisições de espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foram realizadas utilizando 34 janelas de varredura, cada uma com largura de 20 m/z, cobrindo a faixa de 361 a 1033 m/z, com AGC de 1000%, energia de colisão normalizada (NCE) de 27% e resolução de 15.000 (Bekker-Jensen et al., 2020)

Os arquivos brutos gerados no modo DIA foram processados no *software* Spectronaut versão 19 (Biognosys, Zurique, Suíça). As identificações proteicas foram realizadas utilizando o fluxo de trabalho *directDIA*, empregando o banco de dados de referência *B. taurus* (Uniprot; 26.617 entradas, baixado em dezembro de 2025), com configurações padrão de fábrica (BGS) e fluxo de avaliação de método.

As buscas foram conduzidas considerando peptídeos digeridos por Trypsin/P, com comprimento entre 7 e 52 aminoácidos, permitindo até duas clivagens perdidas e até cinco modificações. A oxidação de metionina e a acetilação N-terminal de proteínas foram definidas como modificações variáveis, enquanto a carbamidometilação de cisteína foi considerada modificação fixa. Os seguintes critérios de identificação foram aplicados: Q-value do precursor < 0,01; *posterior error probability* (PEP) do precursor < 0,2; Q-value proteico (experimento) < 0,01; Q-value proteico (run) < 0,05; e PEP proteico < 0,75.

A quantificação proteica *label-free* foi realizada no nível MS2, utilizando normalização entre corridas (*cross-run normalization*) e sem aplicação de estratégias de imputação de dados (Bruderer et al., 2015).

2.10 Análise estatística

As análises estatísticas das variáveis ambientais e espermáticas foram realizadas no SAS OnDemand for Academics (SAS Studio 3.8, Enterprise Edition). Inicialmente, foram obtidas estatísticas descritivas por meio do PROC MEANS, incluindo médias, erro-padrão da média (SEM), valores mínimos e máximos e número de observações. As análises inferenciais foram conduzidas por modelos lineares generalizados mistos (GLMM) utilizando o PROC GLIMMIX, com aproximação de Laplace para estimação por máxima

verossimilhança. Para as variáveis ambientais, foram incluídos os efeitos fixos de raça, período do dia e sua interação. Para os parâmetros espermáticos, foram considerados os efeitos fixos das interações dia × tipo de sêmen e raça × dia × tipo de sêmen, sendo a identidade do animal incluída como efeito aleatório para considerar as medidas repetidas e a variabilidade intra-animal. As distribuições dos modelos (gaussiana ou gama) foram definidas de acordo com a natureza da variável resposta e com o ajuste do modelo, com base nos critérios de informação de Akaike (AIC) e Bayesiano (BIC). Quando observados efeitos significativos, as médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o comando LSMEANS.

Para os dados proteômicos embrionários, as análises multivariadas foram realizadas no MetaboAnalyst 6.0. A PCA foi utilizada para descrever a variação global das amostras entre os grupos experimentais, enquanto a PLS-DA foi empregada para identificar as proteínas mais relevantes na discriminação entre as classes. A relevância das proteínas no modelo foi estimada pelo VIP score, sendo consideradas importantes aquelas com $VIP \geq 1$. Além disso, foi gerado heatmap com agrupamento hierárquico, incluindo dendrogramas, para visualização dos padrões de abundância relativa das proteínas e da similaridade entre grupos experimentais. As diferenças entre os grupos foram também avaliadas por análise de variância de uma via (one-way ANOVA), e os resultados foram interpretados em conjunto com os valores de VIP. A ontologia gênica das proteínas exclusivas de cada momento experimental, bem como a análise das interações proteína-proteína (PPI) e o enriquecimento funcional do proteoma embrionário, foi realizada utilizando a plataforma STRING, considerando as proteínas diferencialmente abundantes identificadas em cada momento experimental e empregando agrupamento por similaridade semântica de 0,8. Os diagramas de Venn foram construídos utilizando a ferramenta web InteractiVenn (Heberle et al., 2015). Em todas as análises os contrastes foram significantes quando $FDR < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados da insulação escrotal

A temperatura média da superfície escrotal durante a insulação não diferiu entre touros HPB e NEL ($36,6 \pm 0,01$ vs. $36,2 \pm 0,01$ °C; $P = 0,23$). As temperaturas máximas observadas foram $37,9$ °C para HPB e $39,1$ °C para NEL.

A insulação escrotal afetou a MT, MP e porcentagem de RAP nos ejaculados, que estavam reduzidos no D28 em ambas as raças (Fig. 1; $P < 0,0001$). Os valores dessas variáveis retornaram a níveis semelhantes ao do momento controle (D-5) a partir do D49. Entretanto, a insulação não afetou a VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, LIN e STR em nenhum dos momentos experimentais (Fig. 1; $P > 0,05$).

A insulação escrotal também afetou a porcentagem de defeitos totais e defeitos menores no ejaculado, cujos valores aumentaram no D28 em ambas as raças (Figura 1; $P < 0,0001$). A partir do D49 essas variáveis retornaram a níveis semelhantes ao do momento controle (D-5).

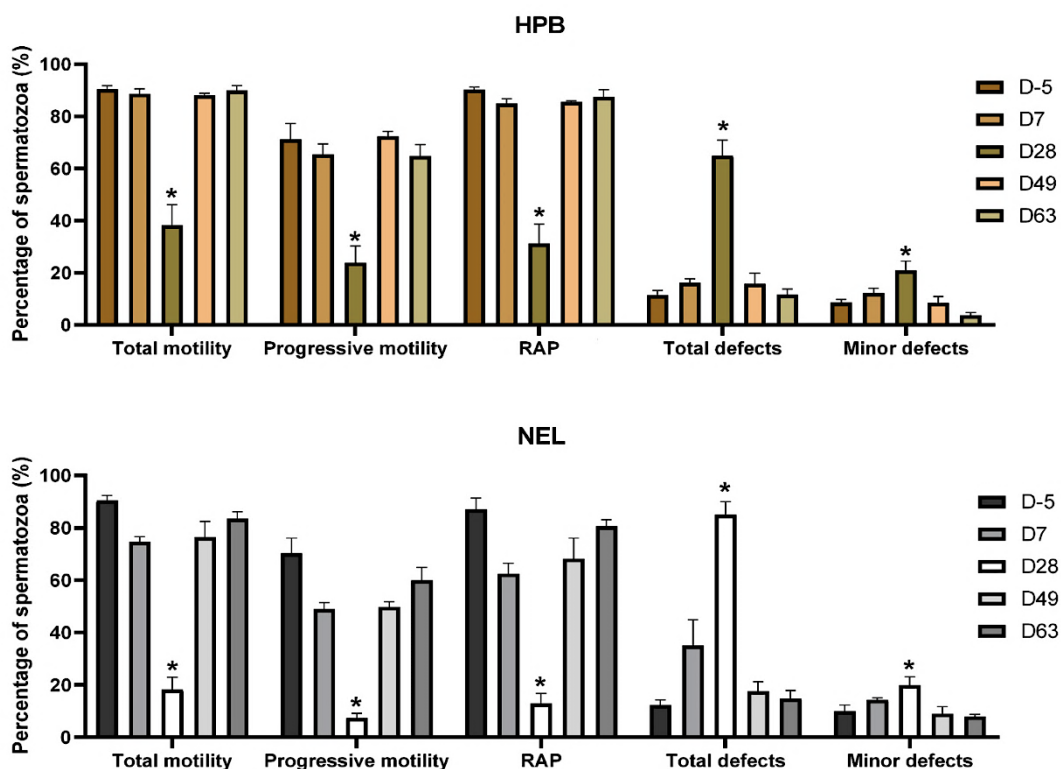


Figura 1. Valores médios $\pm$ EPM da motilidade total, motilidade progressiva,

porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP), defeitos totais e defeitos menores em touros holandeses preto e branco (HPB) e nelore (NEL) nos momentos D-5, D7, D28, D49 e D63, definidos em relação à insulação escrotal (D0 = dia do início da insulação). * Indica diferença significativa entre os momentos avaliados em cada variável ($P < 0,05$).

4. Taxa de produção de Embriões

No grupo HPB, a insulação não alterou a taxa de blastocisto (Fig. 2; $P = 0,167$). Em contraste, no grupo NEL, a insulação reduziu a taxa de blastocisto ($P = 0,0007$), com menores taxas observadas quando empregados os ejaculados criopreservados no D7 e D49 pós-insulação (Fig. 2; $P = 0,0012$ e $P = 0,0045$).

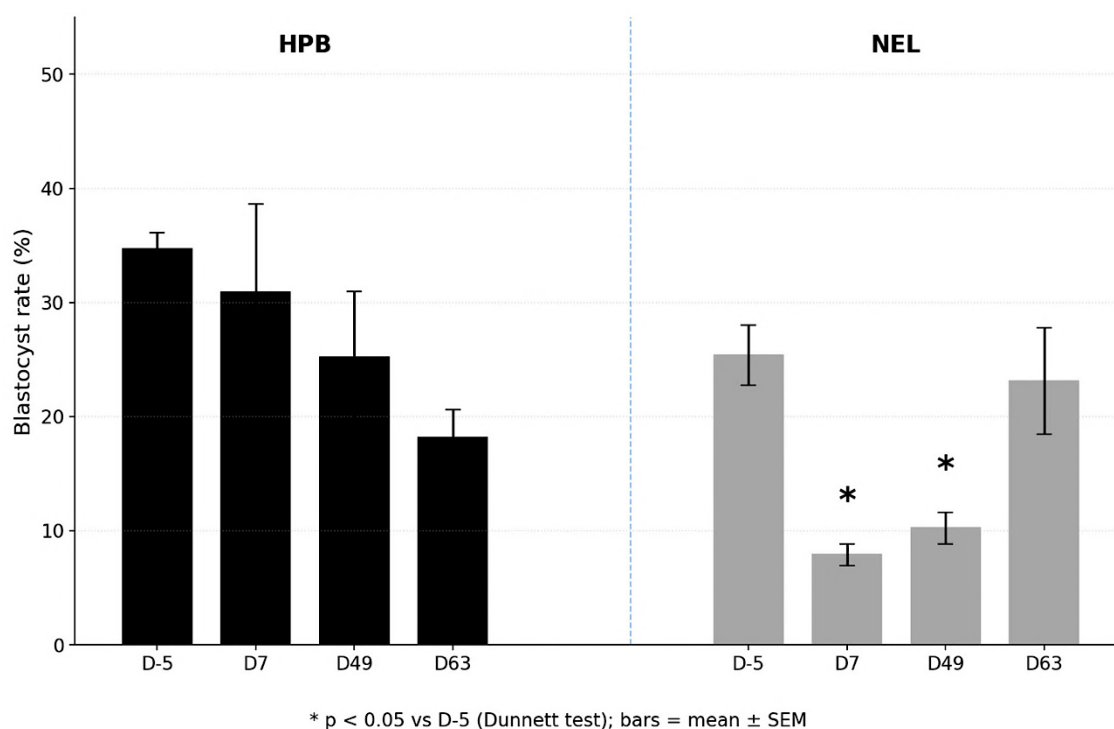


Figura 2. Valores médios $\pm$ EPM da taxa de produção *in vitro* de blastocisto (%) obtida com o sêmen de touros holandeses preto e branco (HPB) e nelore (NEL) criopreservados nos momentos D-5, D7, D28, D49 e D63, definidos em relação à insulação escrotal (D0 = dia do início da insulação). *Indica diferença significativa em relação ao momento D-5 ($p < 0,05$).

5. Proteômica Embrionária

O proteoma dos embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros HPB (*Bos taurus*) e NEL (*Bos indicus*), coletado nos momentos D-5, D7, D49 e D63 após o início da insulação escrotal, compreendeu 357 e 385 proteínas identificadas, respectivamente (Fig. 3). Dentre essas proteínas, 174 foram comuns a todos os momentos de coleta no grupo HPB, enquanto 235 foram compartilhadas entre todos os momentos no grupo NEL. No grupo HPB, foram identificadas exclusivamente 4, 81, 1 e 6 proteínas nos embriões produzidos com sêmen coletado em D-5, D7, D49 e D63, respectivamente. No grupo NEL, esse número foi de 9, 4, 1 e 21 proteínas exclusivas, respectivamente.

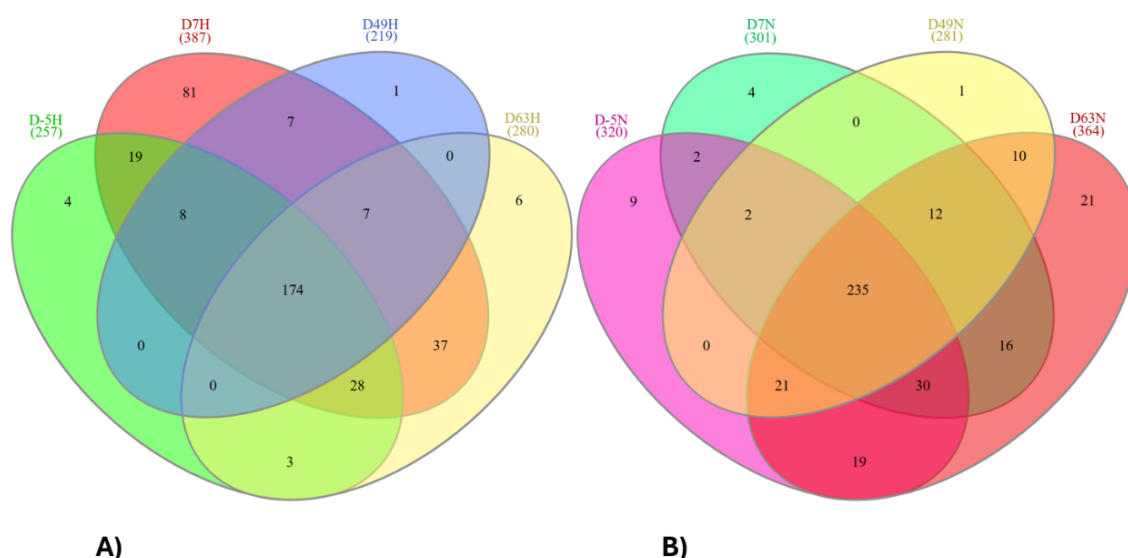
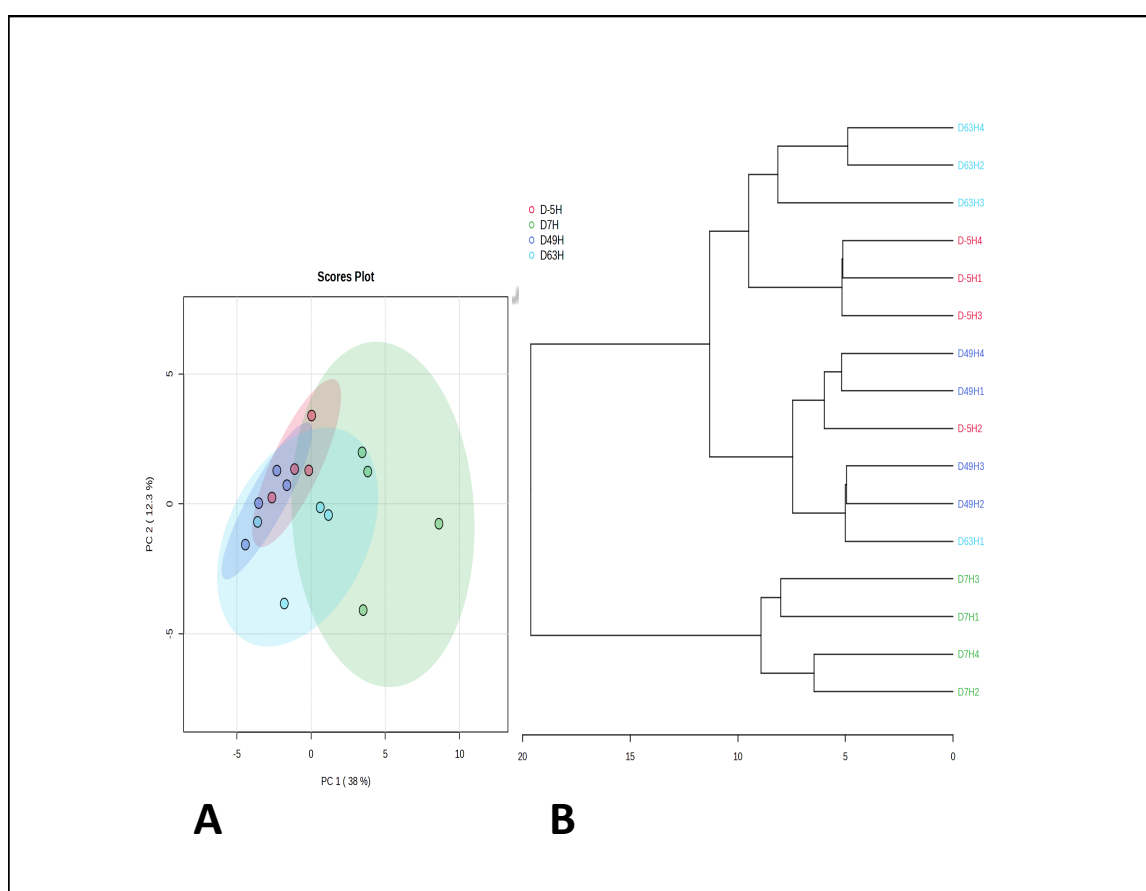


Figura 3. Diagramas de Venn das proteínas identificadas em embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros coletado em D-5, D7, D49 e D63 em relação ao início da insulação escrotal por 48 h. O número total de proteínas encontradas em cada momento aparece junto a identificação dos grupos e o número de proteínas exclusivas de cada momento ou intersecção destes aparecem no interior das elipses. A. *Bos taurus* e B. *Bos indicus*.

5.1 Holandeses

A análise proteômica dos embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros HPB, nos diferentes momentos experimentais após a insulação escrotal, mostrou 41 proteínas diferencialmente abundantes. Entre as

proteínas diferencialmente abundantes (PDA), a maior abundância relativa foi observada predominantemente no momento D7H. A análise de componentes principais (PCA; Fig. 4a) revelou separação das amostras de D7H ao longo do PC1, deslocadas para a direita em relação aos demais momentos, enquanto D-5H, D49H e D63H ocuparam regiões sobrepostas no centro-esquerda do gráfico. O dendrograma de agrupamento hierárquico (Fig. 4b) corroborou esse padrão, com as amostras de D7H formando um cluster coeso e isolado dos demais. Em contraste, as amostras dos demais momentos, apresentaram-se intercaladas em diferentes ramos.



sêmen criopreservado de touros holandeses preto e branco, colhido nos momentos D-5H, D7H, D49H e D63H após o início da insulação escrotal por 48 h. A. Scores plot da análise de componentes principais (PCA). B. Dendrograma de agrupamento hierárquico.

A análise por PLS-DA (Fig. 5A) revelou separação entre os momentos experimentais mais evidente do que aquela observada na análise não supervisionada, permitindo identificar diferenças proteômicas mais sutis. As amostras do D-5H formaram um cluster coeso na região inferior do gráfico, enquanto as do D7H ocuparam a região superior-esquerda; as amostras dos D49H e D63H apresentaram sobreposição parcial na região superior-direita. Com base no VIP score (Fig. 5B), as proteínas que mais contribuíram para a separação das amostras foram Alpha-2-antiplasmin, Translocon-associated protein subunit alpha, Ig-like domain-containing protein e Hsp70 (Heat shock protein family A member 1A), mais abundantes no D7H, e Myocardial zonula adherens protein e Creatine kinase M-type mitochondrial, mais abundante em D-5H.

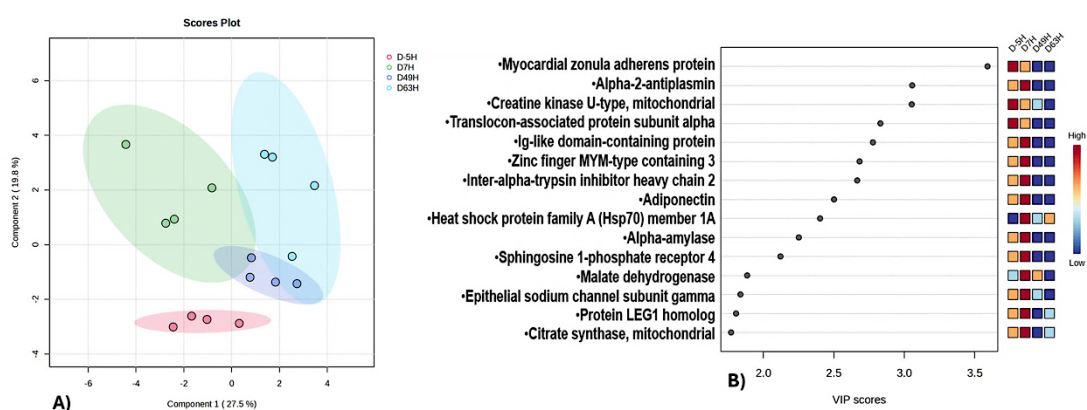


Figura 5. Análise multivariada supervisionada do perfil proteômico de embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros holandeses preto e branco coletado nos D-5H, D7H, D49H e D63H em relação ao início da insulação escrotal por 48 h. A. *Scores plot* da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). B. Classificação das proteínas discriminantes com base no *VIP score*. O *heatmap* lateral indica a abundância relativa das proteínas nos diferentes momentos experimentais.

O heatmap com agrupamento hierárquico (Fig. 6), também revelou um perfil proteico distinto no D7H devido a maior abundancia relativa das proteínas

Acid ceramidase, Nucleobindin-1, Prohibitin 1, Maestro heat like repeat family member 2A, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2, Acrosin-binding protein, Non-selective voltage-gated ion channel VDAC2, Deoxyribonuclease, Angiotensin-converting enzyme, Insulin-degrading enzyme, Heat shock protein beta-1 e Hsp70 (Heat shock protein family A member 1A). Por outro lado, algumas proteínas, exibiram maior abundância relativa em momentos específicos, como Myocardial zonula adherens protein, Alpha-2-antiplasmin, Gelsolin e Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2 em D-5H. Já em D63H, observou-se maior abundância relativa de Acrosin-binding protein, non-selective voltage-gated ion channel VDAC2, Deoxyribonuclease, Angiotensin-converting enzyme, Insulin-degrading enzyme, e Hsp70 (Heat shock protein family A member 1A).

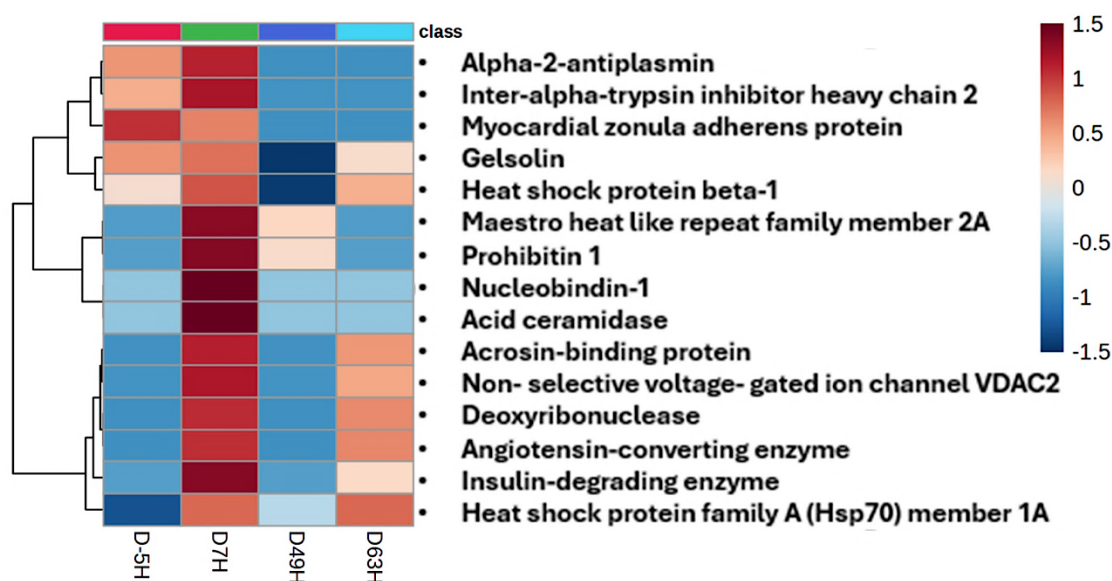


Figura 6. Heatmap do perfil de abundância relativa das proteínas discriminantes em embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros holandeses preto e branco, colhido nos momentos D-5H, D7H, D49H e D63H, definidos em relação ao início da insulação escrotal por 48 h. A escala de cores indica a abundância relativa, sendo vermelho e azul, respectivamente, indicativos de maior e menor abundância.

A ontologia gênica das proteínas PDA exclusivas dos embriões no

momento D7H revelou o enriquecimento dos termos brush border, cluster of actin-based cell projections, chaperonin-containing T-complex, proteasome core complex, melanosome, zona pellucida receptor complex, extracellular space, secretory granule, motile cilium e proteasome core complex, beta-subunit complex, pertencentes à categoria CC; de ATP-dependent protein folding chaperone, pertencente à MF; e, no Reactome, de metabolism, RHOBTB2 GTPase cycle, regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements, cellular response to chemical stress, innate immune system, signaling by the B cell receptor (BCR), association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis, RHOBTB1 GTPase cycle, synthesis of 12-eicosatetraenoic acid derivatives e GSK3B and BTRC:CUL1-mediated degradation of NFE2L2

Nos demais momentos, pelo baixo número de proteínas exclusivas, não apareceram termos enriquecidos.

5.2 Nelore

A análise proteômica dos embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros NEL, nos diferentes momentos experimentais após a insulação escrotal, identificou 18 proteínas diferencialmente abundantes (PDA). Entre as PDA, a maior abundância relativa foi observada predominantemente no momento D63N. A análise de componentes principais (PCA; Fig. 7a) revelou uma tendência de separação ao longo do PC2, com os momentos iniciais (D-5N e D7N) agrupando-se na região superior e os momentos tardios (D49N e D63N) na região inferior, embora com sobreposição parcial entre grupos próximos. O dendrograma (Fig. 7b) corroborou esse padrão, evidenciando agrupamento coeso das amostras D-5N e, em menor grau, D7N, enquanto as amostras D49N e D63N apresentaram maior dispersão, com D63N exibindo a maior heterogeneidade intra-grupo. Esse padrão sugere uma resposta proteômica mais consistente nos momentos iniciais e progressivamente mais variável nos momentos tardios após a insulação escrotal, refletindo uma resposta heterogênea dos embriões ao estresse térmico paterno ao longo do tempo.

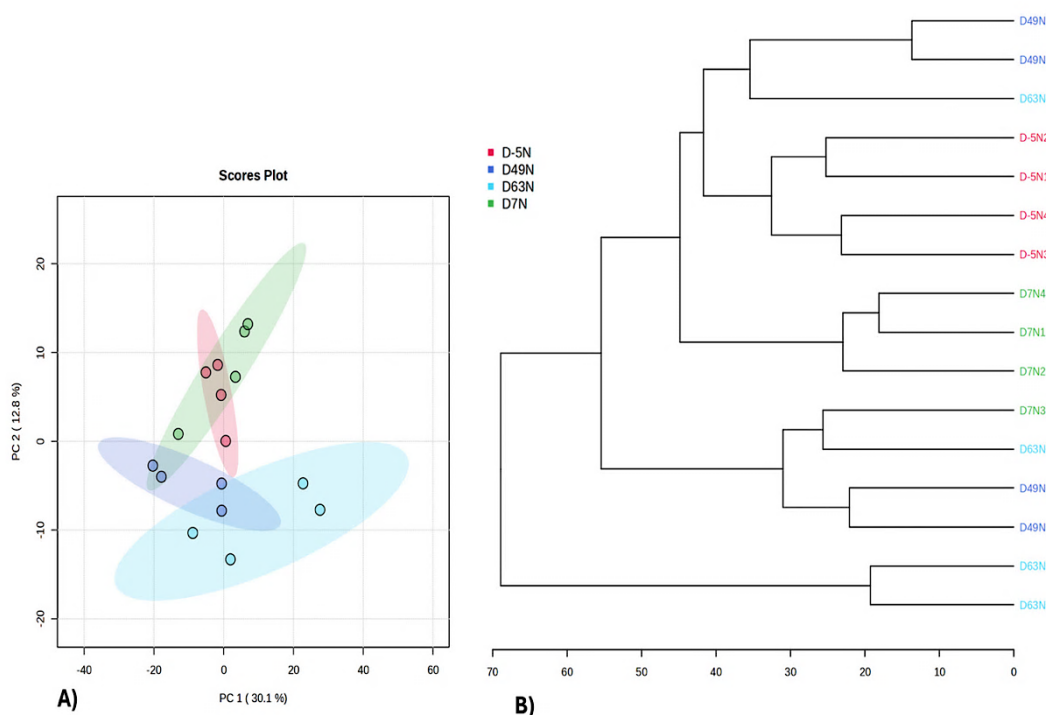


Figura 7. Análise multivariada do perfil proteômico de embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros nelore, colhido nos momentos D-5N, D7N, D49N e D63N, definidos em relação ao início da insulação escrotal por 48 h. (a) Scores plot da análise de componentes principais (PCA). (b) Dendrograma de agrupamento hierárquico das amostras, evidenciando a similaridade entre os perfis proteômicos.

Entretanto, a análise por PLS-DA (Fig. 8a) evidenciou uma discriminação entre os momentos experimentais, permitindo identificar diferenças proteômicas mais nítidas do que as observadas na análise não supervisionada. A distribuição das amostras ao longo do Component 1 revelou uma progressão temporal, com os momentos iniciais (D-5N e D7N) agrupados à esquerda e os momentos tardios (D49N e D63N) deslocados para a direita, corroborando o padrão observado na PCA e no agrupamento hierárquico. A partir da determinação do VIP score (Fig. 8b), as proteínas que mais contribuíram para a separação das amostras foram ferroxidase, alpha-2-macroglobulin, hemopexin, angiotensinogen e afamin. Em concordância com o observado na análise de agrupamento hierárquico, a maioria das proteínas com maiores valores de VIP

score apresentou maior abundância relativa no momento D63N.

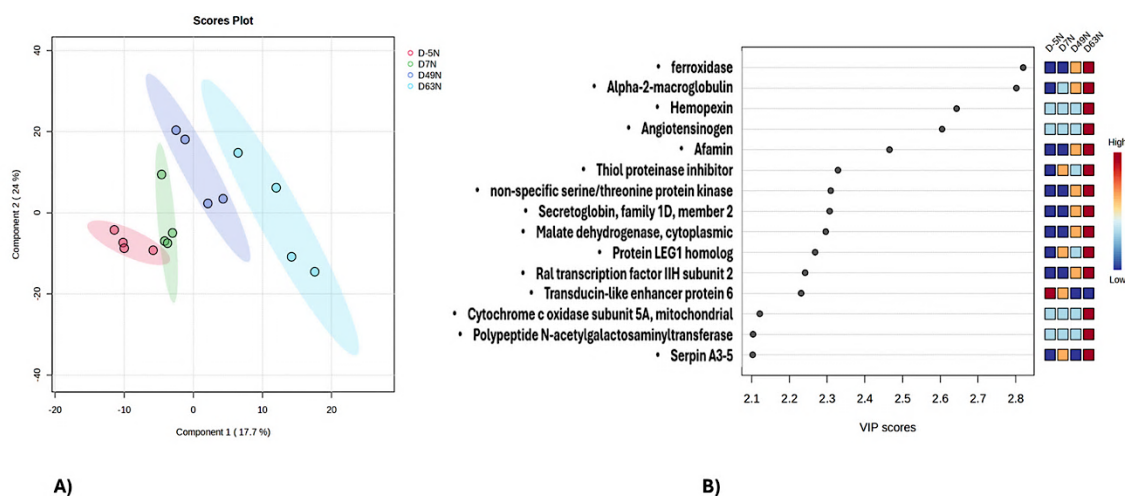


Figura 8. Análise multivariada supervisionada do perfil proteômico de embriões produzidos com sêmen de touros nelore, colhido nos momentos D-5N, D7N, D49N e D63N, definidos em relação ao início da insulação escrotal por 48 h. (a) Scores plot da Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-da). (b) Ranking das proteínas discriminantes obtido a partir do VIP-score. O painel lateral, em heatmap, indica a abundância relativa das proteínas entre os momentos experimentais.

A distribuição das proteínas discriminantes entre os grupos foi também avaliada por meio de heatmap com agrupamento hierárquico (Fig. 9). Observou-se, para a maioria das proteínas, maior abundância relativa no momento D63N, com destaque para Vitronectin, Serpin family D member 1, Angiotensinogen, Hemopexin, Cytochrome c oxidase subunit 5A, ferroxidase e Alpha-2-macroglobulin, que apresentaram padrão de up-regulação evidente nesse momento. Em contraste, o grupo D49N caracterizou-se por uma menor abundância generalizada das proteínas discriminantes. Os momentos D-5N e D7N exibiram perfis intermediários, com algumas proteínas momento-específicas, como Nucleobindin-1, com maior abundância em D-5N, e Cylicin 1 e Glutamate-cysteine ligase, mais abundantes em D7N. O agrupamento hierárquico das proteínas (eixo y) revelou blocos com padrões distintos de

regulação ao longo dos momentos experimentais, reforçando a existência de alterações proteômicas momento-específicas em resposta ao estresse térmico paterno, com a resposta mais pronunciada observada em D63N.

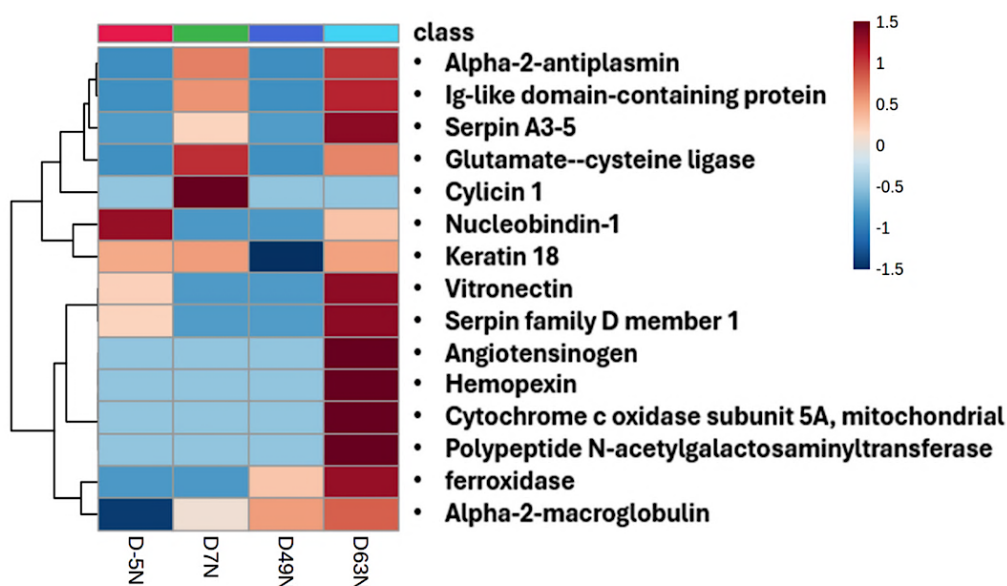


Figura 9. Heatmap do perfil de abundância relativa das proteínas discriminantes em embriões produzidos com sêmen criopreservado de touros nelore, colhido nos momentos D-5N, D7N, D49N e D63N, definidos em relação à insulação escrotal por 48 h. As colunas correspondem aos grupos experimentais e as linhas às proteínas, com agrupamento hierárquico aplicado às proteínas (eixo y). A escala de cores indica a abundância relativa, sendo vermelho e azul, respectivamente, indicativos de maior e menor abundância.

Devido ao reduzido número de proteínas exclusivas nos diferentes momentos experimentais, não houve enriquecimento de vias na ontologia gênica

6. Discussão

A insulação escrotal por 48 horas elevou a temperatura da superfície escrotal, reduzindo o gradiente térmico em relação à temperatura corporal para aproximadamente - 2 °C. Considerando que, em condições fisiológicas, a temperatura da superfície escrotal em bovinos é de aproximadamente 30 °C, e que há um gradiente de cerca de - 4 °C entre a superfície escrotal e a temperatura central do testículo (kastelic et al., 2021), é possível inferir que a

insulação escrotal elevou a temperatura testicular a níveis suprafisiológicos, aproximando-a ou mesmo igualando-a à temperatura corporal, principalmente entre às 11 horas e 16 horas, quando a temperatura da superfície escrotal alcançou valores de 39,1 °C e 37,9 °C, respectivamente, nos grupos NEL e HPB.

A elevação da temperatura testicular é reconhecidamente associada à degeneração testicular e ao comprometimento da espermatogênese (kastelic et al., 2021). No presente estudo, o modelo de aquecimento escrotal produziu o efeito esperado, evidenciado pela redução significativa da (MT), (MP) e (RAP), bem como pelo aumento da porcentagem de defeitos totais e defeitos menores no D28 em ambas as raças, sendo ejaculados espermatozoides derivados de células que eram espermatócitos/espermiogênicos durante o insulto térmico, estágio considerado um dos mais sensíveis ao calor. Esses achados são compatíveis com a literatura, que aponta os espermatócitos como uma das células germinativas mais sensíveis ao estresse térmico (garcía-oliveros et al., 2022). também conforme esperado, a partir do d49, observou-se o retorno das características seminais avaliadas a níveis semelhantes aos observados antes da insulação escrotal, uma vez que, nesse momento, os espermatozoides ejaculados correspondiam a células germinativas que se encontravam em fases de espermatocitogênese no momento do insulto térmico (raman et al., 2011; garcía-oliveros et al., 2022).

da mesma, no d7 pós-insulação, como também observado por mogollón-garcía et al. (2025) ao avaliarem os efeitos do estresse térmico agudo sobre as características seminais durante as 48 horas de insulação escrotal em nelores, não observaram alteração da MT ou da morfologia espermática. Esses achados reforçam a hipótese de que os espermatozoides epididimários são mais resistentes ao insulto térmico do que as células germinativas em desenvolvimento no epitélio seminífero.

A despeito dos efeitos observados sobre a motilidade e a morfologia espermática, as demais variáveis cinemáticas seminais avaliadas (VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, LIN e STR, não se modificaram nos momentos avaliados. Esse resultado sugere que os espermatozoides que sobreviveram ao processo de

degeneração testicular mantiveram, ao menos parcialmente, a funcionalidade dos processos metabólicos e a organização estrutural necessárias à manutenção dos padrões cinemáticos, apesar do aumento de outros defeitos morfológico.

Embora as amostras seminais colhidas nos momentos pós-insulação tenham apresentado características cinemáticas semelhantes às observadas no período pré-insulação, o uso do sêmen obtido nos dias D7 e D49 reduziu a taxa de produção de blastocistos em touros NEL. Esse efeito, entretanto, não foi observado nos touros HPB. Contudo a redução da taxa de produção de blastocistos observada com o uso de sêmen de touros NEL provavelmente decorre de alterações em processos moleculares que não se refletem diretamente na motilidade espermática. Resultados semelhantes foram observados por Fernandes et al. (2008) que demonstraram que insulação escrotal por cinco dias em touros nelore diminui a taxa de produção de blastocistos.

mogollón-garcía *et al.* (2025), por meio de análise proteômica de espermatozoides de touros Nelore submetidos à insulação escrotal por 48 horas, identificaram regulação negativa de vias relacionadas à fosforilação oxidativa (OXPHOS), especialmente de redes associadas ao comprometimento do complexo mitocondrial I, bem como da sinalização estrogênica. Tais alterações podem comprometer funções essenciais à capacidade fecundante, incluindo sobrevivência espermática, capacitação, hiperativação, reação acrossômica e fertilização (aquila; de amicis, 2014; bulkeley *et al.*, 2021).

adicionalmente, rahman et al. (2014) demonstraram que o estresse térmico pode comprometer a integridade nuclear dos espermatozoides ao promover alterações na condensação da cromatina e reduzir seu potencial fertilizante. em estudo anterior, os mesmos autores também verificaram que o uso desses espermatozoides resulta na formação de um pró-núcleo paterno com interrupção do padrão ativo de desmetilação do dna nas primeiras 18 horas após a fertilização (rahman et al., 2013). de forma semelhante, simões et al. (2013), em modelo bovino com diferentes graus de estresse oxidativo espermático, observaram aumento da fragmentação do DNA espermático e da proporção de

blastômeros apoptóticos, sem alteração no número total de células. Em conjunto, esses achados indicam que o dano paterno induzido pelo calor pode comprometer a competência embrionária por mecanismos epigenéticos e apoptóticos, mesmo na ausência de alterações detectáveis nos parâmetros seminais convencionais.

o estresse térmico testicular também favorece o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (eros) e a redução da capacidade antioxidante espermática, promovendo alterações na organização da cromatina, como maior retenção de histonas e hiperacetilação, que a tornam mais instável e suscetível a danos (rahman et al., 2018). embora essas alterações não impeçam necessariamente a fertilização nem os primeiros ciclos de clivagem embrionária, podem induzir apoptose em blastômeros e comprometer a formação de blastocistos (fatehi et al., 2006). esse efeito provavelmente está associado a falhas na reprogramação epigenética do pronúcleo masculino, com impacto negativo sobre a qualidade embrionária (wyck et al., 2018). em conjunto, esses resultados sugerem que a menor taxa de blastocistos observada neste estudo pode resultar da interação entre disfunções mitocondriais, redução da competência fecundante e comprometimento da integridade do material genético espermático.

Embora não tenham sido observadas alterações na taxa de blastocistos em HPB, isso não necessariamente indica ausência de efeitos do estresse térmico. Estudos prévios demonstram que touros Holstein também apresentam redução da competência embrionária quando submetidos ao estresse térmico ambiental (vanselow et al., 2024).

Além da avaliação da competência de desenvolvimento dos embriões produzidos com o emprego de sêmen coletado nos diferentes momentos após a insulação escrotal, foi realizada a análise proteômica embriões produzidos com o objetivo de investigar se esse uso induziu alterações moleculares. Apesar de não ter sido observada redução na taxa de produção de blastocistos com o uso de sêmen criopreservado de touros HPB no D7 (D7H) após a insulação escrotal, esses embriões foram os que apresentaram o maior número de (PDA).

Esse padrão de convergência indica que essas proteínas caracterizam

bem o proteoma dos embriões D7H.

Considerando as PDA (Tabela suplementar 1) e as proteínas discriminantes dos embriões D7H identificadas pelo VIP score e pelo heatmap, observou-se convergência entre as análises. Alpha-2-Antiplasmin, Proteína de choque térmico 70 (HSP70) e cadeia pesada 2 do inibidor inter-alfa-tripsina (ITIH2) foram comuns às três abordagens, enquanto Myocardial Zonula Adherens Protein (MYZAP) e creatina quinase muscular (CKM) também foram destacadas pelo VIP score, e acid ceramidase (ASAH1), deoxyribonuclease, gelsolin, Proteína de choque térmico beta 1 (HSPB1), enzima degradadora de insulina (IDE) e Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2A (MROH2A) pelo heatmap.

A alfa-2-antiplasmina, reconhecida como o principal inibidor fisiológico da plasmina, exerce papel central na regulação do sistema plasminogênio-plasmina e participa de processos como remodelação da matriz extracelular, diferenciação e remodelamento tecidual (carpenter e mathew, 2008; dawley, 2011). Embora, até o momento, não haja descrições de sua atuação em embriões bovinos, sua identificação neste contexto sugere possível envolvimento na modulação dessas atividades durante o desenvolvimento embrionário inicial, possivelmente em resposta à maior demanda por controle proteolítico e reorganização tecidual.

As HSP70 e HSPB1 são proteínas-chave envolvidas na manutenção da proteostase celular, atuando principalmente como chaperonas moleculares no dobramento, reparo e prevenção da agregação de proteínas desnaturadas. Em embriões bovinos, *HSP70* é expressa desde o estágio de duas células, e sua transcrição pode ser induzida em resposta ao estresse térmico (Edwards; Hansen, 1997), estando esse aumento associado à aquisição progressiva de termotolerância durante o desenvolvimento embrionário inicial (De Barros; Paula-Lopes, 2018). A presença concomitante dessas proteínas com componentes do sistema ubiquitina-proteassoma, do complexo *TRiC/CCT*, responsável pelo dobramento de actina, tubulina e outras proteínas com estrutura tridimensional complexa (pokhrel; gestwicki, 2025), e com marcadores da resposta ao estresse mitocondrial, como prohibitina (*PHB1*) e canal aniônico

dependente voltagem 2 (VDAC2), é compatível com o recrutamento coordenado de mecanismos celulares de controle de qualidade proteica nos embriões D7H. Esse perfil sugere que os embriões D7H responderam às alterações moleculares de origem paterna por meio da ativação de mecanismos destinados a preservar a homeostase proteica durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário.

A ITIH2 é uma cadeia pesada inibidora da inter- α -tripsina que está repetidamente associada à estabilização da matriz extracelular, à biologia do hialuronano, à inflamação e a biomarcadores de doenças dependentes do contexto.

A proteína de junção aderente miocárdial (MYZAP), é uma proteína associada às junções aderentes e envolvida na regulação da morfologia celular e da organização do citoesqueleto por meio da sinalização RhoA/SRF (OCHOA *et al.*, 2024). Por analogia, a diminuição da sua abundância relativa nos embriões D7H pode refletir uma resposta adaptativa voltada à manutenção ou reparo da adesão celular.

A CKM está envolvida na produção de fosfocreatina a partir da transferência do grupo fosfato do ATP para a creatina. A fosfocreatina, por sua vez, é exportada para o citosol, onde atua como reserva de alta energia para a rápida regeneração de ATP pelas isoformas citosólicas da creatina quinase (FRITZ-WOLF *et al.*, 1996). Sua regulação negativa nos embriões pode significar um déficit energético nos embriões D7H, que resultou em maior redução embrionária *in vitro*.

A (ASAH1), enzima lisossomal que regula o equilíbrio entre a ceramida pró-apoptótica e a esfingosina-1-fosfato antiapoptótica (gebai *et al.*, 2018), pode refletir uma resposta protetora ao acúmulo de ceramida. Sua relevância para o desenvolvimento embrionário é corroborada por estudos em camundongos, nos quais sua ausência resulta em morte apoptótica no estágio de duas células (ELIYAHU *et al.*, 2007).

A Acrosin-binding protein (ACRBP), DAP também identificados no heatmap e nas PDA totais, está envolvida na ativação do pró-acrosina e na ligação espermática à zona pelúcida (KATO *et al.*, 2021; TUMOVA *et al.*, 2021).

Esta proteína não tem função conhecida no embrião inicial *in vitro*, linhagens celulares humanas de neuroblastoma e células neurais não malignas, a IDE aumenta sob condições de estresse térmico, estresse oxidativo e privação de soro, o que sinaliza uma função do tipo heat shock protein (tundo et al., 2013; lesire et al., 2022).

A Gelsolin está envolvida com o remodelamento de actina, motilidade, apoptose, sinalização de membrana e regulação mitocondrial (feldt et al., 2018; llescas et al., 2021), funções importantes para o desenvolvimento embrionário inicial.

A presença de IDE entre as proteínas positivamente reguladas nos embriões D7H pode ser particularmente relevante, uma vez que, além de atuar como metaloprotease ubíqua envolvida na degradação da insulina e de outros peptídeos bioativos, como glucagon, amilina, IGFs e β -amiloide (gonzález-casimiro et al., 2021). Há evidências *in vitro* em linhagens humanas de neuroblastoma e em células neurais não malignas de que sua expressão aumenta sob estresse térmico, estresse oxidativo e privação de soro, sugerindo um papel funcional semelhante ao de proteínas de choque térmico (tundo et al., 2012; lesire et al., 2022). Nesse contexto, a detecção de IDE pode refletir a ativação de mecanismos adaptativos voltados à manutenção da homeostase proteica e celular em resposta a condições embrionárias adversas.

Entre as PDA reguladas positivamente e identificadas no heatmap, destacam-se proteínas relacionadas à homeostase mitocondrial e à regulação do equilíbrio apoptótico. A PHB1, proteína mitocondrial essencial para a integridade da membrana interna e para organização das cristas, desempenha papel importante na proteção contra o aumento das EROs e contra a apoptose (osman, merkwirth e langer, 2009). Da mesma forma, o VDAC2 também exerce função citoprotetora ao ligar a BAK e mantê-la inativa na membrana mitocondrial externa, prevenindo a permeabilização da membrana externa e liberação do citocromo c (shentu et al., 2026). Em conjunto, a regulação positiva dessas proteínas pode refletir a ativação de mecanismos compensatórios destinados a preservar a função mitocondrial e a viabilidade celular nos embriões D7H.

Apesar de não terem aparecido nas PDA as proteínas adiponectina e

S1PR4 apareceram como proteínas discriminantes reguladas positivamente nos embriões D7H

De modo semelhante, a regulação positiva da adiponectina nos embriões D7H pode ser interpretada como indicativa da ativação de vias relacionadas à sobrevivência celular. Evidências oriundas de embriões murinos pré-implantacionais cultivados *in vitro* demonstram que a suplementação com adiponectina aumenta o número de blastômeros em blastocistos de camundongos (čikoš et al., 2010).

Adicionalmente, a maior abundância de nucleobindina-1 (NUCB1), proteína com dedo de zinco tipo MYM (ZMYM3) e S1PR4 reforça a hipótese de ativação de mecanismos adaptativos nos embriões D7H. A NUCB1, envolvida na homeostase de Ca^{2+} no complexo de Golgi, pode contribuir para a preservação funcional dessa organela e de seu equilíbrio redox, com possível efeito na prevenção do apoptose (pacheco-fernandez et al., 2020; zhang et al., 2019). A ZMYM3, por sua vez, atua na resposta a danos no DNA ao participar do recrutamento de BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY 1 homolog (BRCA1) para regiões de quebras de fita dupla, sendo importante para a recombinação homóloga e a estabilidade genômica (leung et al., 2017). Já a S1PR4, receptor relacionado à sinalização por esfingosina-1-fosfato, está associada a vias de sobrevivência celular (gräler et al., 2003). Embora ainda não descritas no proteoma de blastocistos bovinos, essas proteínas podem compor uma resposta citoprotetora mobilizada em condições de maior desafio celular. A PHB1, adiponectina, a maior abundância de Nucleobindina-1 (NUCB1), ZMYM3 e S1PR4).

Apesar de ter sido observada redução na taxa de produção de blastocistos com o uso de sêmen criopreservado de touros NEL no D7 e D49 após a insulação escrotal, nesses embriões foram observadas nesses dias, respectivamente, apenas 4 e 1 PDA. Paradoxalmente, os embriões D63, momento em que a taxa de produção embrionária foi semelhante ao momento controle apresentaram 21 PDA, com 14 proteínas tendo sido identificadas como discriminantes deste grupo pelo VIP score.

Considerando o proteoma do D63N, as proteínas ferroxidase, alpha-2-

macroglobulin, hemopexin, angiotensinogen, polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase e serpin A3-5 foram consideradas PDA e identificadas simultaneamente no VIP score e heatmap, enquanto alpha-2-antiplasmin, Ig-like domain-containing protein, glutamate-cysteine ligase, cylicin 1, nucleobindin-1, keratin 18, vitronectin e serpin family D member 1 foram identificadas como PDA e no heatmap.

A ferroxidase, glicoproteína multicobre responsável por mais de 95% do cobre circulante, exerce atividade antioxidante ao oxidar o ferro ferroso a férrico, prevenindo a formação de radicais hidroxila pela reação de Fenton e a peroxidação lipídica (gutteridge, 1983).

A alpha-2-macroglobulin, inibidor de protease de amplo espectro com papel na regulação da proteólise extracelular, atua capturando proteases mediante mudança conformacional covalente, sendo proteína de fase aguda com função na proteção do microambiente extracelular (rehmam et al., 2013).

A polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, enzima envolvida na O-glicosilação de proteínas e identificada pelo VIP score e pelas PDA totais, não possui descrição prévia no proteoma de blastocistos bovinos, constituindo achado potencialmente inédito que pode refletir alterações na glicosilação de proteínas embrionárias em resposta ao dano paterno (Tian and Ten Hagen., 2006).

A serpin family D member 1, inibidor de serino-proteases dependente de glicosaminoglicanos (Pak et al., 2004), e a serpin A3-5, confirmada pelas três abordagens analíticas, ampliam esse conjunto de serpinas com relevância para a regulação proteolítica no microambiente embrionário. A convergência dessas proteínas antiproteolíticas indica que, além da defesa antioxidante, os embriões D63N ativaram mecanismos de proteção contra a degradação proteica excessiva, possivelmente em resposta a sinais de dano paterno de natureza mais tardia e acumulativa

A alpha-2-antiplasmin, inibidor fisiológico primário da plasmina com papel na regulação do sistema plasminogênio-plasmina e na remodelação da matriz extracelular (carpenter e mathew, 2008; dawley, 2011), foi identificada no heatmap e nas PDA totais, constituindo achado inédito no proteoma de

blastocistos bovinos e sugerindo ativação de mecanismos de proteção contra proteólise excessiva no microambiente embrionário do grupo Nelore.

A glutamate-cysteine ligase (GCL), enzima limitante na síntese *de novo* de glutathione, foi identificada no heatmap e nas PDA totais com maior abundância no D7N, evidenciando que a resposta antioxidante embrionária no grupo Nelore se inicia antes do pico proteômico observado no D63N. STOVER et al. (2000) demonstraram que embriões murinos pré-implantação aumentam a expressão da GCL especificamente em resposta ao estresse oxidativo direto, e não à depleção de glutathione per se, indicando que essa enzima constitui um mecanismo adaptativo embrionário ativado sob desafio oxidativo agudo. Nesse sentido, a maior abundância de GCL no D7N pode ser interpretada como uma resposta antioxidante precoce que antecipa e prepara o embrião para o padrão de defesa mais amplo que se intensifica progressivamente até o D63N.

A cyclicin 1, proteína estrutural rica em resíduos básicos associada à matriz perinuclear da cabeça espermática (Hess et al., 1993) e essencial para a integridade da forma nuclear do espermatozoide, constitui achado inédito no proteoma embrionário bovino.

A NUCB1, proteína de ligação ao cálcio residente no complexo de Golgi que regula a homeostase de Ca^{2+} e a sinalização de proteínas G heterotriméricas (LIN et al., 1998), Essa diferença temporal entre raças sugere que a dinâmica de expressão da NUCB1 no proteoma embrionário pode ser modulada de forma raça-específica em resposta ao estresse térmico paterno, possivelmente refletindo diferenças na sensibilidade basal dos embriões de cada raça à perturbação da sinalização de Ca^{2+} e da homeostase do Golgi.

A keratin 18, proteína do citoesqueleto de filamentos intermediários com papel na integridade estrutural celular e na sinalização apoptótica, e o Ig-like domain-containing protein (Fortier et al., 2013) foram identificados no heatmap e nas PDA totais, mas não possuem descrição prévia no proteoma de blastocistos bovinos em associação ao estresse térmico paterno, constituindo achados potencialmente inéditos cujo significado funcional nesse contexto permanece a ser elucidado.

A Vitronectin, glicoproteína multifuncional do plasma e da matriz

extracelular com domínios homólogos à família da hemopexina, exerce funções regulatórias na coagulação sanguínea, no sistema complemento e no sistema fibrinolítico (preissner e seiffert, 1998). A hemopexin, proteína de fase aguda com a maior afinidade conhecida por heme livre, atua como antioxidante ao sequestrar a heme circulante, prevenindo o estresse oxidativo mediado por heme e a perda de ferro a ele associado (tolosano e altruda, 2002), sua maior abundância no D63N é consistente com uma intensificação progressiva da defesa antioxidante embrionária ao longo do tempo após a insulação, refletindo a natureza cumulativa do dano oxidativo associado ao estresse térmico paterno no grupo Nelore.

Acrosin-binding protein, Alpha-actinin-1 e Lumican foram identificadas exclusivamente entre as PDA totais, sem confirmação pelo VIP score ou pelo heatmap, sugerindo que, embora estatisticamente diferencialmente abundantes, sua contribuição para a discriminação multivariada entre os momentos foi mais discreta.

7. Conclusão

A insulação escrotal por 48 horas promoveu alterações seminais transitórias e semelhantes em touros Holandeses e Nelore, com redução da motilidade e aumento de defeitos espermáticos no D28, seguidos de recuperação a partir do D49. Contudo, os efeitos do estresse térmico paterno sobre a competência embrionária foram raça-dependentes.

Em touros Holandeses, o principal impacto ocorreu precocemente, no D7, com ampla reprogramação do proteoma embrionário, especialmente em vias relacionadas à proteostase, ao metabolismo energético e ao citoesqueleto, sem redução da taxa de blastocisto. Em touros nelore, a resposta proteômica foi mais tardia, com predomínio de proteínas associadas à defesa antioxidante, e foi acompanhada de redução da taxa de blastocisto, particularmente nos momentos D7 e D49.

Esses resultados demonstram que alterações seminais semelhantes podem resultar em consequências embrionárias distintas entre as raças e indicam que a avaliação baseada apenas em parâmetros seminais convencionais pode subestimar os efeitos do estresse térmico paterno. Assim,

conclui-se que a competência embrionária é afetada de forma raça-dependente pelo estresse térmico testicular, sendo a proteômica embrionária uma abordagem sensível para detectar esses efeitos.

8. REFERÊNCIAS

- Aquila, S., De Amicis, F., 2014. Steroid receptors and their ligands: effects on male gamete functions. *Exp. Cell Res.* 328, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.015>.
- Baker, S.S., Cardullo, R.A., Thaler, C.D., 2002. Sonication of mouse sperm membranes reveals distinct protein domains. *Biol. Reprod.* 66, 57–64. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.57>.
- Basar, M., Bozkurt, I., Guzeloglu-Kayisli, O., Sozen, B., Tekmen, I., Schatz, F., Arici, A., Lockwood, C.J., Kayisli, U.A., 2014. Unfolded protein response prevents blastocyst formation during preimplantation embryo development in vitro. *Fertil. Steril.* 102, 1777–1784. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.004>.
- Bekker-Jensen, D.B., Martínez-Val, A., Steigerwald, S., Rüther, P., Fort, K.L., Arrey, T.N., Harder, A., Makarov, A., Olsen, J.V., 2020. A compact quadrupole-Orbitrap mass spectrometer with FAIMS interface improves proteome coverage in short LC gradients. *Mol. Cell. Proteomics* 19, 716–729. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR119.001906>.
- Bernal-Ulloa, S.M., Heinzmann, J., Herrmann, D., Hader, K.-G., Aldag, P., Winkler, S., Pache, D., Baulain, U., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., 2016. Cyclic AMP affects oocyte maturation and embryo development in prepubertal and adult cattle. *PLoS One* 11, e0150264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150264>.
- Brito, L.F.C., Silva, A.E.D.F., Barbosa, R.T., Kastelic, J.P., 2004. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* 61, 511–528. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00231-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00231-0).
- Bruderer, R., Bernhardt, O.M., Gandhi, T., Miladinović, S.M., Cheng, L.-Y., Messner, S., Ehrenberger, T., Zanotelli, V., Butscheid, Y., Escher, C., Vitek, O., Rinner, O., Reiter, L., 2015. Extending the limits of quantitative proteome profiling

- with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 1400–1410. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044305>.
- Bulkeley, E.A., Foutouhi, A., Wigney, K., Santistevan, A.C., Collins, C., McNabb, B., Meyers, S., 2021. Effects from disruption of mitochondrial electron transport chain function on bull sperm motility. *Theriogenology* 176, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.015>.
- Carpenter, S.L., Mathew, P., 2008. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia* 14, 1250–1254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01766>.
- Čikoš, Š., Burkuš, J., Bukovská, A., Fabian, D., Reháč, P., Koppel, J., 2010. Expression of adiponectin receptors and effects of adiponectin isoforms in mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 25, 2247–2255. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq193>.
- Dawley, B., 2011. Alpha II antiplasmin deficiency complicating pregnancy: a case report. *Obstet. Gynecol. Int.* 2011, 698648. <https://doi.org/10.1155/2011/698648>.
- de Barros, F.R.O., Paula-Lopes, F.F., 2018. Cellular and epigenetic changes induced by heat stress in bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 85, 810–820. <https://doi.org/10.1002/mrd.23040>.
- Dodd, A.R., Luense, L.J., 2024. Contribution of the paternal histone epigenome to the preimplantation embryo. *Front. Cell Dev. Biol.* 12, 1476312. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1476312>.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0).
- Edwards, J.L., Ealy, A.D., Monterroso, V.H., Hansen, P.J., 1997. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 25–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199709\)48:1<25::AID-MRD4>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199709)48:1<25::AID-MRD4>3.0.CO;2-R).
- Eliyahu, E., Park, J.-H., Shtraizent, N., He, X., Schuchman, E.H., 2007. Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. *FASEB J.* 21, 1403–1409. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7016com>.

- Fatehi, A.N., Bevers, M.M., Schoevers, E., Roelen, B.A.J., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 27, 176–188. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04152>.
- Feldt, J., Schicht, M., Garreis, F., Welss, J., Schneider, U.W., Paulsen, F., 2018. Structure, regulation and related diseases of the actin-binding protein gelsolin. *Expert Rev. Mol. Med.* 20, e7. <https://doi.org/10.1017/erm.2018.7>.
- Fernandes, C.E., Dode, M.A.N., Pereira, D., Silva, A.E.D.F., 2008. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology* 70, 1560–1568. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.005>.
- Fresa, K.J., Cheng, M.-H., Larson, K.Y., Crook, A.A., Saviola, A.J., Gonzalez-Castro, R.A., Chen, T.W., Carnevale, E.M., 2025. Delayed blastocyst development is associated with altered metabolism and proteome in male and female bovine embryos. *Biol. Reprod.* 112, 1072–1085. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaf058>.
- Fritz-Wolf, K., Schnyder, T., Wallimann, T., Kabsch, W., 1996. Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* 381, 341–345. <https://doi.org/10.1038/381341a0>.
- Fortier, A., Asselin, E. and Cadrin, M. (2013). Keratin 8 and 18 Loss in Epithelial Cancer Cells Increases Collective Cell Migration and Cisplatin Sensitivity through Claudin1 Up-regulation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, pp. 11555 - 11571. doi: 10.1074/jbc.m112.428920.
- Garcia-Oliveros, L.N., de Arruda, R.P., Batissaco, L., Gonzaga, V.H.G., Nogueira, V.J.M., Florez-Rodriguez, S.A., Almeida, F.D.S., Alves, M.B.R., Costa Pinto, S.C., Nichi, M., Losano, J.D.A., Kawai, G.K.V., Celeghini, E.C.C., 2020. Heat stress effects on bovine sperm cells: a chronological approach to early findings. *Int. J. Biometeorol.* 64, 1367–1378. <https://doi.org/10.1007/s00484-020-01917-w>.
- Gebai, A., Gorelik, A., Li, Z., Illes, K., Nagar, B., 2018. Structural basis for the activation of acid ceramidase. *Nat. Commun.* 9, 1621. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03844-2>.

- González-Casimiro, C.M., Merino, B., Casanueva-Álvarez, E., Postigo-Casado, T., Cámara-Torres, P., Fernández-Díaz, C.M., Leissring, M.A., Cózar-Castellano, I., Perdomo, G., 2021. Modulation of insulin sensitivity by insulin-degrading enzyme. *Biomedicines* 9, 86. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010086>.
- Gräler, M.H., Grosse, R., Kusch, A., Kremmer, E., Gudermann, T., Lipp, M., 2003. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J. Cell. Biochem.* 89, 507–519. <https://doi.org/10.1002/jcb.10537>.
- Gutteridge, J.M.C., 1983. Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett.* 157, 37–40. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)81111-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)81111-9).
- Hetz, C., Zhang, K., Kaufman, R.J., 2020. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>.
- Hess, H., Heid, H. and Franke, W. (1993). Molecular characterization of mammalian cylicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 122, pp. 1043 - 1052. doi: 10.1083/jcb.122.5.1043.
- Hinsch, K.-D., De Pinto, V., Aires, V.A., Schneider, X., Messina, A., Hinsch, E., 2004. Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J. Biol. Chem.* 279, 15281–15288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313433200>.
- Hu, M., Bai, Y., Zhang, C., Liu, F., Cui, Z., Chen, J., Peng, J., 2016. Liver-enriched gene 1, a glycosylated secretory protein, binds to FGFR and mediates an anti-stress pathway to protect liver development in zebrafish. *PLoS Genet.* 12, e1005881. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005881>.
- Humbert, S., van Vuuren, H., Lutz, Y., Hoeijmakers, J.H., Egly, J.M., Moncollin, V., 1994. p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *EMBO J.* 13, 2393–2398. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06523.x>.
- Illescas, M., Peñas, A., Arenas, J., Martín, M.A., Ugalde, C., 2021. Regulation of mitochondrial function by the actin cytoskeleton. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 795838.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.795838>.

Jousan, F.D., Hansen, P.J., 2007. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 189–196. <https://doi.org/10.1002/mrd.20527>.

Kastelic, J.P., Rizzoto, G., Shahat, A.M., Ferreira, J.C.P., Thundathil, J.C., 2021. Pathogenesis and mitigation of the deleterious effects of heat stress on bull reproduction. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 45, 518–524.

Leese, H.J., Brison, D.R., Sturmey, R.G., 2022. The quiet embryo hypothesis: 20 years on. *Front. Physiol.* 13, 899485. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.899485>.

Lesire, L., Leroux, F., Deprez-Poulain, R., Deprez, B., 2022. Insulin-degrading enzyme, an under-estimated potential target to treat cancer? *Cells* 11, 1228. <https://doi.org/10.3390/cells11071228>.

Lin, P., Le-Niculescu, H., Hofmeister, R., McCaffery, J.M., Jin, M., Hennemann, H., McQuistan, T., De Vries, L., Farquhar, M.G., 1998. The mammalian calcium-binding protein, nucleobindin (CALNUC), is a Golgi resident protein. *J. Cell Biol.* 141, 1515–1527. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1515>.

Llamas Luceño, N., de Souza Ramos Angrimani, D., de Cássia Bicudo, L., Szymańska, K.J., Van Poucke, M., Demeyere, K., Meyer, E., Peelman, L., Mullaart, E., Broekhuijse, M.L.W.J., Van Soom, A., 2020. Exposing dairy bulls to high temperature-humidity index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development in vitro. *Theriogenology* 141, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.034>.

López-Damián, E.P., Jiménez-Medina, J.A., Alarcón, M.A., Lammoglia, M.A., Hernández, A., Galina, C.S., Fiordeliso, T., 2020. Cryopreservation induces higher oxidative stress levels in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*. *Theriogenology* 143, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.12.001>.

Luo, S., Wehr, N.B., Levine, R.L., 2006. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal. Biochem.* 350, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.048>.

Mogollón-García, H.D., Pupulim, A.G.R., Ribeiro, G.C., Rate, P.Z., Rizzoto, G.,

- Kastelic, J.P., Kasimanickam, R., Souza, F.F., Ferreira, J.C.P., 2026. Acute scrotal insulation in Nelore bulls impairs oxidative phosphorylation and estrogen signaling in epididymal sperm. *Theriogenology* 252, 117781. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.117781>.
- Nagasawa, K., Higashi, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K., 2007. Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO Rep.* 8, 483–489. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400933>.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H., 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* 6, 427–448. <https://doi.org/10.1002/elps.1150060905>.
- Ochoa, J.P., Lalaguna, L., Mirelis, J.G., Dominguez, F., Gonzalez-Lopez, E., Salas, C., Roustan, G., McGurk, K.A., Zheng, S.L., Barton, P.J.R., Ware, J.S., Gómez-Gaviro, M.V., Lara-Pezzi, E., Garcia-Pavia, P., 2024. Biallelic loss of function variants in myocardial zonula adherens protein gene (MYZAP) cause a severe recessive form of dilated cardiomyopathy. *Circ. Heart Fail.* 17, e011226. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.123.011226>.
- Osman, C., Merkwirth, C., Langer, T., 2009. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J. Cell Sci.* 122, 3823–3830. <https://doi.org/10.1242/jcs.037655>.
- Pak, S.C., Kumar, V., Tsu, C., Luke, C.J., Askew, Y.S., Askew, D.J., Mills, D.R., Brömme, D., Silverman, G.A., 2004. SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins. *J. Biol. Chem.* 279, 15448–15459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400261200>.
- Papa, P.M., Papa, F.O., Oliveira, L.A., Guasti, P.N., Castilho, C., Giometti, I.C., 2015. Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 161, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.004>.
- Paula-Lopes, F.F., Lima, R.S., Satrapa, R.A., Barros, C.M., 2013. Physiology and endocrinology symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos*

taurus) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *J. Anim. Sci.* 91, 1143–1153. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5802>.

Peach, M., Marsh, N., MacPhee, D.J., 2012. Protein solubilization: attend to the choice of lysis buffer. *Methods Mol. Biol.* 869, 37–47. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_4.

Pfeffer, S., Dudek, J., Schaffer, M., Ng, B.G., Albert, S., Plitzko, J.M., Baumeister, W., Zimmermann, R., Freeze, H.H., Engel, B.D., Förster, F., 2017. Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex. *Nat. Commun.* 8, 14516. <https://doi.org/10.1038/ncomms14516>.

Preissner, K.T., Seiffert, D., 1998. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb. Res.* 89, 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(97\)00298-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(97)00298-3).

Rahman, M.B., Vandaele, L., Rijsselaere, T., Maes, D., Hoogewijs, M., Frijters, A., Noordman, J., Granados, A., Dernelle, E., Shamsuddin, M., Parrish, J.J., Van Soom, A., 2011. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology* 76, 1246–1257. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.031>.

Rahman, M.B., Kamal, M.M., Rijsselaere, T., Vandaele, L., Shamsuddin, M., Van Soom, A., 2014. Altered chromatin condensation of heat-stressed spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 1107–1116. <https://doi.org/10.1071/RD13218>.

Rahman, M.B., Schellander, K., Luceño, N.L., Van Soom, A., 2018. Heat stress responses in spermatozoa: mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology* 113, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.012>.

Shentu, J., Xu, H., Jin, L., Duan, S., 2026. VDAC2: an emerging pivotal and multifaceted regulator in tumor biology. *Apoptosis* 31, 61. <https://doi.org/10.1007/s10495-026-02278-2>.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>.

Silva, C.F., Sartorelli, E.S., Castilho, A.C.S., Satrapa, R.A., Puelker, R.Z., Razza, E.M., Ticianelli, J.S., Eduardo, H.P., Loureiro, B., Barros, C.M., 2013. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology* 79, 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.003>.

Simões, R., Feitosa, W.B., Siqueira, A.F.P., Nichi, M., Paula-Lopes, F.F., Marques, M.G., Peres, M.A., Barnabe, V.H., Visintin, J.A., Assumpção, M.E., 2013. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction* 146, 433–441. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0123>.

Souza, F.F., Chirinéa, V.H., Martins, M.I.M., Lopes, M.D., 2009. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (Suppl. 2), 283–286. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01447.x>.

Staub, C., Johnson, L., 2018. Review: spermatogenesis in the bull. *Animal* 12 (Suppl. 1), s27–s35. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>.

Stover, S.K., Gushansky, G.A., Salmen, J.J., Gardiner, C.S., 2000. Regulation of γ -glutamate-cysteine ligase expression by oxidative stress in the mouse preimplantation embryo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 153–159. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.9030>.

Tian, E. and Hagen, K. T. T. (2006). Expression of the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family is spatially and temporally regulated during *Drosophila* development.. *Glycobiology*, 16 2, pp. 83-95 . doi: 10.1093/glycob/cwj051.

Tundo, G.R., Sbardella, D., Ciaccio, C., Bianculli, A., Orlandi, A., Desimio, M.G., Arcuri, G., Coletta, M., Marini, S., 2013. Insulin-degrading enzyme (IDE): a novel heat shock-like protein. *J. Biol. Chem.* 288, 2281–2289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393108>.

Vanselow, J., Wesenauer, C., Eggert, A., Sharma, A., Becker, F., 2024. Summer

heat during spermatogenesis reduces in vitro blastocyst rates and affects sperm quality of next generation bulls. *Andrology* 12, 1897–1906. <https://doi.org/10.1111/andr.13627>.

Wyck, S., Herrera, C., Requena, C.E., Bittner, L., Hajkova, P., Bollwein, H., Santoro, R., 2018. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. *Epigenetics Chromatin* 11, 60. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0224-y>.

Zhang, Y., Wang, Y., Read, E., Fu, M., Pei, Y., Wu, L., Wang, R., Yang, G., 2020. Golgi stress response, hydrogen sulfide metabolism, and intracellular calcium homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* 32, 583–601. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7824>.

9. Material Suplementar

1. Tabela Proteínas diferencialmente abundantes identificadas em embriões produzidos com sêmen criopreservados de touros HPB em D-5, D7, D49, D63 em relação ao início da insulação escrotal

ID	Protein names	Gene Names	Grups				
Q17QB3	Acid ceramidase	ASAH1	D7H-D5H	D7H-D49H	D7H - D63H		
Q0P569	Nucleobindin-1	NUCB1	D7HD-5H	D7H-D49H	D7H - D63H		
A0A3Q1MAH7	Non-selective voltage-gated ion channel VDAC2	VDAC2	D63H-D-5H	D7H - D-5H	D63H - D49H	D7H - D49H	D7H - D63H
A0AAA9RW75	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	ITIH2	D-5H - D49H	D-5H - D63H	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H
E1B7S8	Acrosin-binding protein	ACRBP	D63H - D-5H	D7H - D-5H	D63H - D49H	D7H - D49H	
P28800	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2 PLI	D-5H - D49H	D-5H - D63H	D7H - D49H	D7H - D63H	
A0AAA9TQ30	Angiotensin	ACE	D63H - D-5H	D7H - D-5H	D63H - D49H	D7H - D49H	
Q3T165	Prohibitin 1	PHB1 PHB	D49H - D-5H	D7H - D-5H	D49H - D63H	D7H - D49H	D7H - D63H
Q3T149	Heat shock protein beta-1	HSPB1 HSP27	D-5H - D49H	D63H - D49H	D7H - D49H		
F1N1I6	Gelsolin	GSN	D-5H - D49H	D63H - D49H	D7H - D49H		
F1MGQ1	Deoxyribonuclease	DNASE1L3	D63H - D-5H	D7H - D-5H	D63H - D49H	D7H - D49H	
F1N2J6	Myocardial zonula adherens protein	MYZAP	D-5H - D49H	D-5H - D63H	D7H - D49H	D7H - D63H	
A0AAA9U0H2	Insulin-degrading enzyme	IDE	D63H - D-5H	D7H - D-5H	D63H - D49H	D7H - D49H	D7H - D63H
F1MZK6	Maestro heat like repeat family member 2A	MROH2A	D49H - D-5H	D7H - D-5H	D49H - D63H	D7H - D49H	D7H - D63H

A0AAF6YYN3	Heat shock protein family A (Hsp70)	HSPA1A	D49H - D-5H	D63H - D-5H	D7H - D-5H	D63H - D49H	D7H - D49H
G5E5C6	Acrosin	ACR	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
G5E589	Proteasome subunit beta	PSMB1	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0A3Q1LT26	PTPRF interacting protein alpha 4	PPFIA4	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A6QQ77	Sperm acrosome membrane-associated protein 3	SPACA3	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0A3Q1M7E3	Glutathione peroxidase	GPX5 LOC112441537	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
F1MDK8	ADP/ATP translocase	SLC25A31	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
Q5E9B7	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0AAA9SR81	Phosphoglycerate kinase	PGK 2,00	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0A3Q1NA56	Nucleolar complex protein 3 homolog	NOC3L	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0A452DJA8	Purine nucleoside phosphorylase	PNP	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0AAA9U1W7	Nucleobindin 2	NUCB2	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
P45879	Non-selective voltage-gated ion channel VDAC1	VDAC1	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
Q9XSC6	Creatine kinase M-type	CKM	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0AAA9T0U0	ferroxidase (EC 1.16.3.1)	CP	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
G3N3K5	T cell-interacting, activating receptor on myeloid cells 1	TARM1	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0AAF6Z6F6	Oocyte expressed protein	OOEP	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
Q3ZBS7	Vitronectin	VTN	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		

Q5EA77	Sorting nexin-17	SNX17	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
G3N0V2	Type-II keratin Kb1	KRT1	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
P81019	Seminal plasma protein BSP-30 kDa (BSP-30K)	SFP4_BOVIN	D-5H - D49H	D63H - D49H	D7H - D49H		
P24627	Lactotransferrin	LTF	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0ABI0NLQ8	Kappa-casein	CSN3	D-5H - D49H	D63H - D49H	D7H - D49H		
Q5XQN5	Type-II keratin Kb5	KRT5	D7H - D-5H	D7H - D49H	D7H - D63H		
A0AAF6YQA7	Proteasome 20S subunit alpha 1	PSMA1	D7H - D-5H	D63H - D49H	D7H - D49H		
Q29RK1	Citrate synthase	CS	D-5H - D49H	D7H - D49H	D7H - D63H		

2. Tabela diferencialmente abundantes identificadas em embriões produzidos com sêmen criopreservados de touros NEL em D-5, D7, D49, D63 em relação ao início da insulação escrotal

ID	Protein names	Gene Names	Grups			
A0A452DI25	Hemopexin	HPX	D63N - D-5N	D63N - D7N		
P01017	Angiotensinogen	AGT SERPINA8	D63N - D-5N	D63N - D7N		
F6S1Q0	Keratin 18	KRT18	D-5N - D49N	D7N - D49N		
A0A3Q1LWV8	Ig-like domain-containing protein		D63N - D-5N	D63N - D49N	D7N - D49N	
Q7SIH1	Alpha-2-macroglobulin	A2M	D49N - D-5N	D7N - D-5N		
A0A3Q1MN33	Glutamate	GCLC	D63N - D-5N	D63N - D49N	D7N - D49N	
P28800	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2 PLI	D63N - D-5N	D63N - D49N	D7N - D49N	

F6R4P6	Serpin family D member 1	SERPIND1	D-5N - D49N	D-5N - D7N	D63N - D49N	D63N - D7N
A2I7N1	Serpin A3-5	SERPINA3-5	D63N - D-5N	D63N - D49N	D7N - D49N	D63N - D7N
Q3ZBS7	Vitronectin	VTN	D-5N - D49N	D-5N - D7N	D63N - D49N	D63N - D7N
A0AAA9T0U0	ferroxidase	CP	D49N - D-5N	D63N - D49N	D49N - D7N	D63N - D7N
Q0P569	Nucleobindin-1	NUCB1	D-5N - D49N	D63N - D49N	D63N - D7N	
P00426	Cytochrome	COX5A	D63N - D-5N	D63N - D7N		
G3MY76	Cylicin 1	CYLC1	D7N - D-5N	D7N - D63N		
E1BDW8	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT11	D63N - D-5N	D63N - D7N		
Q05443	Lumican	LUM LDC	D63N - D-5N	D63N - D7N		
Q3B7N2	Alpha-actinin-1	ACTN1	D63N - D-5N	D63N - D7N		
E1B7S8	Acrosin-binding protein	ACRBP	D63N - D-5N	D63N - D7N		