

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU - UNESP

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO ESCROTAL EM
TOUROS *BOS INDICUS* E *BOS TAURUS* SOBRE A FUNÇÃO
ESPERMÁTICA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

THAINÁ SALLUM BACCO MANSSUR

**Botucatu,
2026**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU - UNESP

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO ESCROTAL EM
TOUROS *BOS INDICUS* E *BOS TAURUS* SOBRE A FUNÇÃO
ESPERMÁTICA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biomoleculares e
Farmacológicas para obtenção do título
de MESTRE.

Aluno: Thainá Sallum Bacco Manssur
Orientador: Prof. Dr. Anthony César de
Souza Castilho

**Botucatu,
2026**

M289i Manssur, Thainá
Influência do estresse térmico escrotal em touros bos indicus e bos taurus sobre a função espermática e produção in vitro de embriões / Thainá Manssur. -- , 2026
80 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu,
Orientador: Anthony Castilho

1. Insulação testicular. 2. Bos indicus. 3. Bos taurus. 4. blastocistos. 5. reprodução. I. Título.

Título: INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO ESCROTAL EM TOUROS
BOS INDICUS E *BOS TAURUS* SOBRE A FUNÇÃO ESPERMÁTICA E
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

Presidente da Comissão

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Unoeste – Presidente
Prudente, SP, Brasil

Profa. Dra. Máira Bianchi Rodrigues Alves

Membro

Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única – UNESP – Jaboticabal,
SP, Brasil

Dra. Sarah Gomes Nunes

Membro

Empresa BlastoCell Biotecnologia

Data da defesa: 28 de janeiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e à minha família, por serem meu alicerce e fonte de força, especialmente nos momentos em que tudo parecia inalcançável. À minha mãe Tharsila, ao meu pai Calil, à minha irmã Thalia, aos meus avós, madrinhas, tios e primos, deixo minha eterna gratidão pelo apoio incondicional e por acompanharem cada passo da minha caminhada. Em particular, à minha madrinha Thaisa, agradeço por ter me apresentado ao universo da pesquisa e por ser, desde sempre, um exemplo inspirador. Aos meus amigos, destaco a Thinani, obrigada por estarem presentes, oferecendo escuta, companheirismo e incentivo constantes.

Ao meu orientador, Prof. Anthony Castilho, registro minha sincera gratidão por todas as oportunidades, pela confiança depositada e por cada ensinamento transmitido, assim como pela cumplicidade e amizade ao longo desses anos. Obrigada por acreditar em mim desde o início da graduação (2017), por abrir as portas da ciência e me guiar durante toda a minha formação acadêmica. Ao meu coorientador, Prof. João Carlos Ferreira, agradeço pela confiança, pela generosidade em compartilhar seu conhecimento e pela oportunidade de integrar este projeto. Sua orientação cuidadosa, dedicação e apoio constante foram determinantes para que este trabalho se concretizasse, sendo essencial em momentos decisivos do meu percurso.

Expresso minha sincera gratidão ao Prof. José Buratini por abrir as portas do laboratório de Fisiologia ovariana e permitir o desenvolvimento dos meus experimentos, assim como ao Prof. Rafael Nóbrega, chefe do Departamento de Fisiologia, pelo apoio constante ao longo dos anos em que estive vinculada ao departamento. Agradeço também a todos os colaboradores desse setor, que, de diferentes maneiras, contribuíram para a realização deste trabalho. Ao Prof. Frederico Papa e à Profa. Eunice Oba, agradeço a parceria que possibilitou o uso do sistema CASA. Registro, ainda, minha gratidão aos pós-graduandos que estiveram envolvidos nas coletas de sêmen, em especial ao Renan.

À Thaisy, deixo um agradecimento pelos ensinamentos. Ao Vitor, agradeço a parceria e companheirismo, assim como aos demais pós-graduandos da Unesp de Botucatu e da Unoeste de Presidente Prudente, em especial a Carol, Bruno e Enzo, que compartilharam momentos importantes e

colaborações valiosas durante este processo. Ao Luiz, agradeço a parceria dentro e fora do ambiente acadêmico. Obrigada por compartilhar comigo a vida, por todo apoio, paciência e incentivo, tornando essa jornada mais leve.

Sou grata também à Botupharma pela parceria no fornecimento dos meios de congelamento espermática e produção *in vitro* de embriões, e à Frigol pelo fornecimento dos ovários, sem os quais este projeto não seria possível. Agradeço a CAPES #001 pelo apoio a pesquisa e fornecimento de bolsa.

Por fim, agradeço à Medicina Veterinária, profissão pela qual me encanto e me apaixono a cada dia. Ser médica veterinária é mais do que uma escolha profissional: é um propósito de vida, que me permite cuidar, aprender e contribuir para além de mim mesma. É uma honra poder colaborar com o avanço da ciência brasileira por meio deste trabalho, que representa não apenas uma conquista acadêmica, mas também pessoal.

RESUMO

MANSSUR, T. S. B. Influência do estresse térmico escrotal em touros *Bos indicus* e *Bos taurus* sobre a função espermática e produção *in vitro* de embriões. Botucatu, 2026, 81p. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, IBB – Campus Botucatu.

O estresse térmico é um importante fator limitante da reprodução bovina, comprometendo a espermatogênese e a qualidade espermática. O objetivo desta dissertação foi investigar as consequências reprodutivas do estresse térmico agudo em touros e seus reflexos na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Para isso, quatro touros Nelore (*Bos indicus*) e quatro Holandeses (*Bos taurus*) foram submetidos à insulação escrotal por 48 horas, utilizando fraldas pediátricas. As coletas seminais foram realizadas nos momentos -5 (basal), 7, 28, 49 e 63 dias após o insulto térmico. O sêmen foi criopreservado, selecionado por gradiente de densidade (Select Sperm®, 45%/90%) após descongelação e avaliado quanto aos parâmetros cinéticos e morfológicos; em seguida, foi submetido à PIVE. Os resultados evidenciaram um padrão dinâmico de injúria dependente da fase da espermatogênese afetada. Aos 7 dias pós-insulto, observou-se manutenção da motilidade espermática, acompanhada pelo surgimento precoce de alterações morfológicas. Esses efeitos resultaram em desfechos embrionários distintos entre as raças: no Nelore, houve redução na taxa de blastocistos, enquanto no Holandês observou-se diminuição do número total de células embrionárias. O pico de severidade ocorreu no dia 28, com prejuízos generalizados na motilidade, na integridade espermática e na capacidade fertilizante. A recuperação foi assimétrica ao longo do tempo: embora os parâmetros cinéticos tenham se restabelecido a partir do dia 49, defeitos espermáticos morfológicos persistentes, como anomalias de cauda no Nelore, associada a baixa da taxa embrionários, e o reaparecimento do fenótipo de *pouch formation* no Holandês no D63, sem impacto evidente sobre os embriões. A análise molecular dos blastocistos não evidenciou alterações na expressão de genes associados à pluripotência (NANOG e OCT4), competência embrionária (PLAC8) e apoptose (BAX), apesar dos déficits funcionais observados. Os dados foram submetidos

à análise estatística por meio de ANOVA ou teste de Kruskal–Wallis, conforme a normalidade dos dados, utilizando o software JMP Statistical Software, version 7.0. Em síntese, o estresse térmico induz uma resposta reprodutiva temporalmente organizada, caracterizada pelo surgimento precoce (D7) de alterações morfológicas e comprometimento da produção embrionária, seguido por um pico de disfunção espermática no dia 28 e recuperação incompleta ao longo do tempo. Embora a motilidade espermática seja restabelecida, defeitos estruturais persistentes continuam a impactar o desenvolvimento embrionário, evidenciando uma dissociação entre recuperação funcional e competência reprodutiva. Além disso, os efeitos sobre os desfechos embrionários são dependentes da raça e não são adequadamente refletidos pelos parâmetros seminais convencionais. Esses achados demonstram que a avaliação da fertilidade pós-estresse térmico requer abordagens mais abrangentes, capazes de integrar qualidade espermática e resposta embrionária.

Palavras-chave: Insulação testicular, *Bos indicus*, *Bos taurus*, blastocistos, reprodução

ABSTRACT

MANSSUR, T. S. B. Influence of scrotal heat stress in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls on sperm function and *in vitro* embryo production. Botucatu, 2026, 81p. Master's thesis – São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, IBB – Campus Botucatu.

Heat stress is an important limiting factor in bovine reproduction, impairing spermatogenesis and sperm quality. The objective of this dissertation was to investigate the reproductive consequences of acute heat stress in bulls and its effects on *in vitro* embryo production (IVP). To this end, four Nelore bulls (*Bos indicus*) and four Holstein bulls (*Bos taurus*) were subjected to scrotal insulation for 48 hours using disposable diapers. Semen collections were performed at -5 (baseline), 7, 28, 49, and 63 days after the thermal insult. Semen samples were cryopreserved, selected by density gradient centrifugation (Select Sperm®, 45%/90%) after thawing, and evaluated for kinetic and morphological parameters; subsequently, they were used for IVP. The results revealed a dynamic pattern of injury dependent on the stage of spermatogenesis affected. At 7 days post-insult, sperm motility was maintained, accompanied by the early onset of morphological abnormalities. These alterations resulted in distinct embryonic outcomes between breeds: in Nelore, there was a reduction in blastocyst rates, whereas in Holstein a decrease in total embryonic cell number was observed. The peak of severity occurred at day 28, characterized by generalized impairments in motility, sperm integrity, and fertilizing capacity. Recovery was asymmetric over time: although kinetic parameters were restored from day 49 onwards, persistent morphological sperm defects—such as tail abnormalities in Nelore, associated with reduced embryonic rates, and the reappearance of the *pouch formation* phenotype in Holstein at day 63, without evident impact on embryos—continued to influence reproductive outcomes. Molecular analysis of blastocysts did not reveal changes in the expression of genes associated with pluripotency (NANOG and OCT4), embryonic competence (PLAC8), or apoptosis (BAX), despite the observed functional deficits. Data were analyzed using ANOVA or Kruskal–Wallis tests, according to data normality,

using JMP Statistical Software, version 7.0. In summary, heat stress induces a temporally organized reproductive response, characterized by the early onset (day 7) of morphological abnormalities and impairment of embryo production, followed by a peak of sperm dysfunction at day 28 and incomplete recovery over time. Although sperm motility is restored, persistent structural defects continue to impair embryonic development, indicating a dissociation between functional recovery and reproductive competence. Furthermore, the effects on embryonic outcomes are breed-dependent and are not adequately reflected by conventional semen parameters. These findings demonstrate that the assessment of fertility following heat stress requires more comprehensive approaches integrating sperm quality and embryonic response.

Keywords: Thermal insulation, *Bos indicus*, *Bos taurus*, blastocysts, reproduction

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Estresse térmico em bovinos	5
2.2 Estresse térmico na fisiologia reprodutiva dos touros	10
2.3 Efeito do estresse térmico nos espermatozoides	14
2.4 Impacto do sêmen estressado termicamente na produção <i>in vitro</i> de embriões	19
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
4. HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
4.1. Hipótese(s)	23
4.2. Objetivo geral	23
4.3. Objetivos específicos	23
5. REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2	
ARTIGO CIENTÍFICO	47
1. Introduction	48
2. Materials and methods	49
2.1. Experimental design	49
2.2. Animals	52
2.3. Scrotal Insulation and Semen Collection	52
2.4. Semen Cryopreservation	53
2.5. Sperm Selection for <i>In Vitro</i> Embryo Production and Semen Evaluation	54
2.6. Semen Evaluate	54
2.6.1. Sperm Morphology and Plasma Membrane Integrity	54
2.6.2 Sperm Kinetics	54
2.7. <i>In vitro</i> Embryo Production	55
2.7.1. Oocyte Collection and <i>Cumulus</i> -Oocyte Complex (COC) Selection ..	54
2.7.2 <i>In Vitro</i> Maturation (IVM)	55

2.7.3. <i>In Vitro</i> Fertilization (IVF)	56
2.7.4. <i>In Vitro</i> Culture (IVC).....	56
2.7.5. Blastocyst Rate	56
2.7.6. Total Cell Count in Blastocysts	56
2.7.7. Embryo Storage	57
2.8. Analysis of Embryo Gene Expression	57
2.9. Statistical Analysis	58
3. Results	58
3.1.3. Seminal Evaluation	58
3.2. Sperm Morphology and Membrane Integrity	59
3.2.1. Sperm Kinetics	62
3.2.2. <i>In vitro</i> embryo production.....	63
3.2.2. Blastocyst Rates	64
3.2.2. Embryonic Quality	65
4. Discussion.....	67
5. References.....	73

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A pecuária bovina representa uma das principais fontes de proteína animal em escala global, contribuindo para a segurança alimentar e para o desenvolvimento socioeconômico de diversos países (FURMAN et al., 2024). No Brasil, a cadeia produtiva de carne e leite destaca-se como componente fundamental da economia (BISCOLA; MALAFAIA, 2025). Contudo, o desempenho reprodutivo ainda constitui um ponto de vulnerabilidade para a eficiência produtiva do setor (RASOOL et al., 2025).

Condições ambientais adversas, desafios sanitários e deficiências nutricionais atuam como fatores de estresse capazes de impactar diretamente a fertilidade dos animais (FERNANDEZ-NOVO et al., 2020). Esses estímulos desencadeiam respostas fisiológicas complexas, que comprometem a homeostase do organismo e interferem em eventos essenciais à reprodução (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017).

Dentre os fatores estressantes, os de natureza climática assumem particular relevância, uma vez que variáveis como frio, calor, umidade, chuva, gelo e vento podem afetar o sistema endócrino e reprodutivo (LEES et al., 2019). Embora relacionados ao mesmo contexto ambiental, o estresse por calor e por frio resultam em consequências distintas, e seus efeitos variam conforme a latitude e a intensidade da exposição (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017). O estresse térmico por calor tem sido mais amplamente investigado em virtude das mudanças climáticas contemporâneas, que se manifestam tanto de forma gradual quanto episódica (BERMAN, 2019; KAN et al., 2023). O incremento de 1,25 °C na temperatura média global, decorrente do progressivo aquecimento, bem como eventos extremos, como ondas de calor (≥ 5 dias com 5 °C acima da máxima histórica), comprometem a produtividade em diferentes sistemas pecuários (RUST, 2019; MARX; HAUNSCHILD; BORNMANN, 2021; MATTHEWS; WYNES, 2022).

O sistema reprodutivo masculino é particularmente sensível ao aumento de temperatura, uma vez que a espermatogênese em mamíferos depende da manutenção da temperatura testicular aproximadamente entre 2 e 6 °C abaixo da temperatura corporal, condição necessária para a produção de espermatozoides morfolologicamente normais e viáveis (FREEMAN, 1990; TAKAHASHI, 2011; KASTELIC; RIZZOTO; THUNDATHIL, 2018). Quando

ocorre comprometimento da termorregulação testicular, a elevação térmica local afeta diretamente a espermatogênese, resultando em anomalias morfológicas, redução da motilidade e da concentração espermática, além de alterações na condensação da cromatina (PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009; LLAMAS-LUCENA et al., 2020a; GARCIA-OLIVEROS et al., 2020). Tais alterações não comprometem apenas a fertilidade imediata, mas podem também impactar a qualidade embrionária, uma vez que defeitos na protaminação do DNA espermático têm sido associados a falhas na reprogramação epigenética durante a fertilização (RAHMAN et al., 2014).

Estudos em bovinos (BARTH; BOWMAN, 1994; GARCIA-OLIVEROS et al., 2020) e ovinos (ALVES et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2025) demonstraram que células germinativas em meiose (espermátocitos) ou em espermiogênese (espermátides) são particularmente sensíveis ao estresse térmico, com efeitos que podem se manifestar no ejaculado semanas após o insulto (RAHMAN et al., 2011). Adicionalmente, evidências indicam que alterações adquiridas durante a maturação epididimária sob estresse térmico podem comprometer a capacidade fertilizante *in vitro*, com repercussões em eventos iniciais pós-fertilização (RAHMAN et al., 2014). De forma consistente, Llamas-Luceño et al. (2020a) observaram que a utilização de sêmen obtido após episódios de estresse térmico resultou em diminuição das taxas de clivagem e de blastocisto, bem como em atraso na eclosão embrionária. Em conjunto, esses achados sugerem que o estresse térmico pode induzir alterações moleculares persistentes nos espermatozoides, as quais se tornam evidentes após a fertilização e comprometem o desenvolvimento embrionário inicial.

Apesar dos avanços no entendimento dos efeitos do estresse térmico sobre a espermatogênese e a função espermática, as consequências do uso de sêmen de reprodutores expostos ao estresse térmico sobre o perfil gênico embrionário e a viabilidade dos embriões ainda permanecem pouco exploradas. Sabe-se que o estresse térmico testicular pode alterar a expressão de genes críticos para a esteroidogênese, o que pode refletir em mudanças no potencial fertilizante do espermatozoide. No entanto, permanece necessária a compreensão de como essas modificações influenciam a regulação gênica durante a embriogênese inicial e se afetam a viabilidade dos embriões

produzidos (RIZZOTO et al., 2020a; LLAMAS-LUCEÑO et al., 2020a; MALDONADO et al., 2025).

Considerando que parte dos efeitos do estresse térmico pode emergir de forma tardia e repercutir após a fertilização, torna-se relevante integrar desfechos embrionários e avaliações moleculares da competência de desenvolvimento, avançando da descrição do dano espermático para a compreensão de suas consequências biológicas no embrião. Além disso, diferenças fisiológicas entre genótipos bovinos podem modular a resposta ao insulto térmico. Em particular, *Bos taurus* e *Bos indicus* diferem quanto à tolerância ao estresse térmico e à capacidade de termorregulação testicular, o que pode influenciar a resistência celular ao calor e a magnitude das alterações espermatogênicas observadas (KASTELIC; RIZZOTO, 2021). Assim, uma abordagem comparativa entre esses genótipos permite avaliar, de forma mais abrangente, o impacto do estresse térmico masculino sobre o desempenho embrionário e sobre assinaturas transcricionais associadas à viabilidade.

Diante desse contexto, o presente estudo propôs investigar os efeitos do estresse térmico em reprodutores bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus* sobre a taxa de blastocistos, o perfil transcricional e a viabilidade de embriões produzidos por fertilização *in vitro*, utilizando-se sêmen coletado após a indução de hipertermia testicular. Essa abordagem permitirá identificar possíveis assinaturas transcricionais associadas à qualidade embrionária, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mitigatórias na pecuária frente aos desafios climáticos.

17. CAPUCO, A. V. et al. Prolactin and growth hormone stimulation of lactation in mice requires thyroid hormones. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, n. 4, p. 345-351, 1999.
18. CARVALHO, F. A. et al. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 12, p. 3570-3573, 1995.
19. CATOZZI, C. et al. In-vitro effect of heat stress on bovine monocytes' lifespan and polarization. **Immunobiology**, v. 225, n. 2, p. 151888, 2020.
20. CECCO, P. Á. et al. Skin transcriptome analysis in Brangus cattle under heat stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 121, p. 103852, 2024.
21. CELEGHINI, E. C. C. et al. Bovine testicular heat stress: From climate change to effects on microRNA profile. **Animal Reproduction Science**, v. 270, p. 107620, 2024.
22. CHACUR, M. G. M. et al. Influência de um nutracêutico no sêmen, testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens *Bos taurus indicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 439-450, 2010.
23. CHANG, A. J. et al. Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 240-244, 2015.
24. CHEN, S. et al. Exposure to heat-stress environment affects the physiology, circulation levels of cytokines, and microbiome in dairy cows. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14606, 2018.
25. CHITKARA, M. et al. Omics approaches to understand impact of heat stress on semen quality and fertility in bovines. **Animal Reproduction Science**, p. 107786, 2025.
26. COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10367-10380, 2017.
27. COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 653-671, 1994.
28. DAHL, G. E.; TAO, S.; LAPORTA, J. Heat stress impacts immune status in cows across the life cycle. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 116, 2020.
29. DUKES, H. H. Dukes: fisiologia dos animais domésticos. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 725 p.
30. DURAIRAJANAYAGAM, D.; AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 14-27, 2015.
31. FERNANDEZ-NOVO, A. et al. The effect of stress on reproduction and reproductive technologies in beef cattle—A review. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2096, 2020.
32. FREEMAN, S. The evolution of the scrotum: a new hypothesis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 145, n. 4, p. 429-445, 1990.
33. FURMAN, S. V. et al. Key indicators of beef safety and quality as important aspects of conservation. **Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences**, v. 7, n. 1, p. 68-73, 2024.
34. GARCIA-OLIVEROS, L. N. et al. Heat stress effects on bovine sperm cells: a chronological approach to early findings. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, n. 8, p. 1367-1378, 2020.
35. GARCIA-OLIVEROS, L. N. et al. Chronological characterization of sperm morpho-functional damage and recovery after testicular heat stress in Nellore bulls. **Journal of Thermal Biology**, v. 106, p. 103237, 2022.
36. GILBERT, I. et al. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1073-1086, 2007.
37. GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.
38. GRANDIN, T. Evaluation of the welfare of cattle housed in outdoor feedlot pens. **Veterinary and Animal Science**, v. 1, p. 23-28, 2016.
39. HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal: anatomia da reprodução masculina. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. cap. 1, p. 3-12.
40. HALES, J. R. S.; WEBSTER, M. E. D. Respiratory function during thermal tachypnoea in sheep. **The Journal of Physiology**, v. 190, n. 2, p. 241-260, 1967.

41. HALLI, K. et al. Identification of candidate genes on the basis of SNP by time-lagged heat stress interactions for milk production traits in German Holstein cattle. **PLoS One**, v. 16, n. 10, p. e0258216, 2021.
42. HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 349-360, 2004.
43. HIKIM, A. P. S. et al. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 85, n. 2-5, p. 175-182, 2003.
44. JOHNSON, H. D.; VANJONACK, W. J. Effects of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating animals. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 9, p. 1603-1617, 1976.
45. KADOKAWA, H.; SAKATANI, M.; HANSEN, P. J. Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. **Animal science journal**, v. 83, n. 6, p. 439-445, 2012.
46. KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock production science**, v. 77, n. 1, p. 59-91, 2002.
47. KAN, Y. et al. The molecular basis of heat stress responses in plants. **Molecular Plant**, v. 16, n. 10, p. 1612-1634, 2023.
48. KASTELIC, J. P. et al. Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. **Veterinárni medicína**, v. 62, n. 8, 2017.
49. KASTELIC, J. P. et al. Hyperthermia is more important than hypoxia as a cause of disrupted spermatogenesis and abnormal sperm. **Theriogenology**, v. 131, p. 177-181, 2019.
50. KASTELIC, J. P.; COOK, R. Byrne; COULTER, Glenn H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **Reproduction**, v. 108, n. 1, p. 81-85, 1996.
51. KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H.; COOK, R. B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology**, v. 44, n. 1, p. 147-152, 1995.
52. KASTELIC, J. P.; RIZZOTO, G. Thermoregulation of the testes. **Bovine reproduction**, p. 40-46, 2021.
53. KASTELIC, J. P.; RIZZOTO, G.; THUNDATHIL, J. Testicular vascular cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen quality and sperm production in bulls. **Animal**, v. 12, n. s1, p. s133-s141, 2018.
54. KASTELIC, J. P. Understanding and evaluating bovine testes. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 18-23, 2014.
55. LECCHI, C. et al. In vitro assessment of the effects of temperature on phagocytosis, reactive oxygen species production and apoptosis in bovine polymorphonuclear cells. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 182, p. 89-94, 2016.
56. LEDOUX, S. P. et al. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 434, n. 3, p. 149-159, 1999.
57. LEES, A. M. et al. Effect of heat stress on rumen temperature of three breeds of cattle. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, n. 2, p. 207-215, 2018.
58. LEES, A. M. et al. The impact of heat load on cattle. **Animals**, v. 9, n. 6, p. 322, 2019.
59. LEMAL, P. et al. Invited review: From heat stress to disease—Immune response and candidate genes involved in cattle thermotolerance. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 7, p. 4471-4488, 2023.
60. LLAMAS-LUCEÑO, N. et al. High temperature-humidity index compromises sperm quality and fertility of Holstein bulls in temperate climates. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 10, p. 9502-9514, 2020. (A)
61. LLAMAS-LUCEÑO, N. et al. Exposing dairy bulls to high temperature-humidity index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development in vitro. **Theriogenology**, v. 141, p. 16-25, 2020. (B)
62. LORD-FONTAINE, S.; AVERILL-BATES, D. A. Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 8, p. 752-765, 2002.
63. LUE, Y. et al. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the “two-hit” approach to male contraceptive development. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1414-1424, 2000.
64. MADER, T. L.; Bill E. Kunkle Interdisciplinary Beef Symposium: Animal welfare concerns for cattle exposed to adverse environmental conditions. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 12, p. 5319-5324, 2014.

65. MALDONADO, M. B. C et al. Effects of endometrial embryokines on the preimplantation bovine embryo to create a gene expression signature consistent with a high competence phenotype. **Biology of Reproduction**, v. 112, n. 3, p. 447-457, 2025.
66. MARX, W.; HAUNSCHILD, R.; BORNMANN, L. Heat waves: a hot topic in climate change research. **Theoretical and applied climatology**, v. 146, n. 1, p. 781-800, 2021.
67. MATTHEWS, H. D.; WYNES, S. Current global efforts are insufficient to limit warming to 1.5 °C. **Science**, v. 376, n. 6600, p. 1404-1409, 2022.
68. MCGUIRE, M. A. et al. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. **Journal of animal science**, v. 69, n. 5, p. 2050-2056, 1991.
69. MORRELL, J.M. Heat stress and bull fertility. **Theriogenology** **2020**, 153, 62–67.
70. MOST, M. S.; YATES, D. T. Inflammatory mediation of heat stress-induced growth deficits in livestock and its potential role as a target for nutritional interventions: A review. **Animals**, v. 11, n. 12, p. 3539, 2021.
71. NAGY, Á. et al. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, n. 3, p. 370-381, 2015.
72. NICHII M. et al. Seasonal variation in semen quality in Bos indicus and Bos taurus. **Theriogenology**, v. 66, p.822-8, 2006
73. PAUL, C. et al. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**, v. 136, n. 1, p. 73, 2008.
74. PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 5, p. 913-919, 2009.
75. PAULA-LOPES, F. F. et al. Physiology and endocrinology symposium: Influence of cattle genotype (Bos indicus vs. Bos taurus) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1143-1153, 2013.
76. PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 75, n. 1, p. 40-47, 2008.
77. RAHMAN, M. B. et al. Altered chromatin condensation of heat-stressed spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 8, p. 1107-1116, 2014.
78. RAHMAN, M. B. et al. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**, v. 113, p. 102-112, 2018.
79. RAHMAN, M. B. et al. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, p. 1246-1257, 2011.
80. RASOOL, A. et al. Reproductive aging in farm animals: Impacts on fertility and strategies for mitigation: A narrative review. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2025.
81. RHOADS, M. L. et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986-1997, 2009.
82. RIZZOTO, G. et al. Acute mild heat stress alters gene expression in testes and reduces sperm quality in mice. **Theriogenology**, v. 158, p. 375-381, 2020. (a).
83. RIZZOTO, G. et al. Short-term testicular warming under anesthesia causes similar increases in testicular blood flow in Bos taurus versus Bos indicus bulls, but no apparent hypoxia. **Theriogenology**, v. 145, p. 94-99, 2020. (b)
84. RIZZOTO, G. et al. Testicular hyperthermia increases blood flow that maintains aerobic metabolism in rams. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 4, p. 683-688, 2019.
85. ROOT, A. W. et al. The interrelationships of thyroid and growth hormones: effect of growth hormone releasing hormone in hypo- and hyperthyroid male rats. **European Journal of Endocrinology**, v. 113, n. 4_Supplement, p. S367-S375, 1986.

86. RUBBO, H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 42, p. 26066-26075, 1994.
87. RUST, J. M. The impact of climate change on extensive and intensive livestock production systems. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 20-25, 2019.
88. SABÉS-ALSINA, M. et al. Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen: A retrospective analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5623-5633, 2019.
89. SANTOS, J. E. P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 513-535, 2004.
90. SEIFI-JAMADI, A. et al. Influence of seasonal differences on semen quality and subsequent embryo development of Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 158, p. 8-17, 2020.
91. SETCHELL, B. P. The scrotum and thermoregulation. **The mammalian testis**, v. 90, 1978.
92. SHIRAISHI, K. Heat and oxidative stress in the germ line. In: **Studies on men's health and fertility**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 149-178.
93. SIQUEIRA, A. F. P. et al. Sperm traits on in vitro production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0200273, 2018.
94. SIVAKUMAR, A. V. N.; SINGH, G.; VARSHNEY, V. P. Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1462-1468, 2010.
95. SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, n. 6, p. 1784-1790, 1966.
96. SQUIRES, E. J. **Applied animal endocrinology**. GB: Cabi, 2024.
97. STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 191-208, 2000.
98. SWANSON, R. M. et al. Heat stress-induced deficits in growth, metabolic efficiency, and cardiovascular function coincided with chronic systemic inflammation and hypercatecholaminemia in ractopamine-supplemented feedlot lambs. **Journal of animal science**, v. 98, n. 6, p. skaa168, 2020.
99. TAKAHASHI, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. **Reproductive medicine and biology**, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2011.
100. TANGA, B. M. et al. Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment—A review. **Animal bioscience**, v. 34, n. 8, p. 1253, 2021.
101. TEIXEIRA, M. B. et al. Heat stress induced by testicular insulation for 24 or 48 h rapidly impairs epididymal sperm quality and reduces spermatogenesis in rams. **Small Ruminant Research**, v. 243, p. 107443, 2025.
102. WAGNER, A. E.; MUIR, W. W.; HINCHCLIFF, K. W. Cardiovascular effects of xylazine and detomidine in horses. **American journal of veterinary research**, v. 52, n. 5, p. 651-657, 1991.
103. WAITES, G. M. H. The effect of heating the scrotum of the ram on respiration and body temperature. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences: Translation and Integration**, v. 47, n. 4, p. 314-323, 1962.
104. WAITES, G. M. H.; SETCHELL, B. P. Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. **Reproduction**, v. 8, n. 3, p. 339-349, 1964.
105. WEST, J. W.; MULLINIX, B. G.; BERNARD, J. K. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 232-242, 2003.
106. WILTBANK, M. C. et al. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 239-253, 2016.
107. WORKU, D. et al. Candidate genes associated with heat stress and breeding strategies to relieve its effects in dairy cattle: a deeper insight into the genetic architecture and immune response to heat stress. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1151241, 2023.
108. YAERAM, J.; SETCHELL, B. P.; MADDOCKS, S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 6, p. 647-653, 2006.
109. ZHANG, M. et al. Impacts of heat stress on meat quality and strategies for amelioration: a review. **International journal of biometeorology**, v. 64, n. 9, p. 1613-1628, 2020.
110. ZHU, B.; SETCHELL, B. P. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. **Reproduction Nutrition Development**, v. 44, n. 6, p. 617-629, 2004.