



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ALAN MARTINS DE ARAÚJO

RESPOSTAS TERMOFISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE CARNEIROS
DESLANADOS SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO MODERADO INDUZIDO
POR INSULAÇÃO ESCROTAL

FORTALEZA

2026

ALAN MARTINS DE ARAÚJO

RESPOSTAS TERMOFISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE CARNEIROS
DESLANADOS SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO MODERADO INDUZIDO POR
INSULAÇÃO ESCROTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Zootecnia. Área de concentração: Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.

Coorientadora: Dr^a. Denise Damasceno Guerreiro

FORTALEZA

2026

ALAN MARTINS DE ARAÚJO

RESPOSTAS TERMOFISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE CARNEIROS
DESLANADOS SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO MODERADO INDUZIDO POR
INSULAÇÃO ESCROTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Zootecnia.
Área de concentração: Zootecnia.

Aprovado em: 09/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arlindo de A. A. N. Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr.^a. Denise Damasceno Guerreiro (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Antonio Delfino Barbosa Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Davide Rondina
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por tornar possível a realização deste sonho, pelas conquistas alcançadas e pela força concedida nos momentos de desafio e resiliência.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ), pela oportunidade de realização do mestrado e pelo amadurecimento proporcionado à minha formação como profissional e pesquisador.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e por viabilizar minha permanência no âmbito acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) – Reprodução Animal, pelo suporte financeiro destinado à execução desta pesquisa.

Ao meu orientador, professor Dr. Arlindo Moura, pela orientação, pelos ensinamentos compartilhados e pelo norte científico ao longo de toda a trajetória do mestrado.

À banca examinadora, composta pelo Prof. Dr. Arlindo Moura, Dr^a. Denise Damasceno Guerreiro, Prof. Dr. José Antonio Delfino e Prof. Dr. Davide Rondina, agradeço pela disponibilidade e pelas contribuições técnicas e científicas que enriqueceram este trabalho e contribuíram para o seu aprimoramento.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal, pela infraestrutura disponibilizada e pelo suporte técnico e científico essenciais à condução deste estudo. Agradeço, de modo especial, aos colegas de pós-graduação M.Sc. Nágila Matos, Dr. Eduardo Pessoa, M.Sc. Bruno Ramires e Dr^a. Denise Guerreiro, pela colaboração, parceria e contribuições ao longo do desenvolvimento do trabalho. Estendo também meus agradecimentos aos bolsistas de Iniciação Científica Flávia Alessandra, Flávia Teodósio, Ícaro Oliveira, Emanuel Ricarte e Samuel Ruivo, pelo empenho e dedicação nas atividades experimentais.

Ao professor Dr. Aderson Viana, pela disponibilização da estrutura e pelo acompanhamento durante a realização do estudo.

À Dr^a. Gaby Palomino, pelo acompanhamento, parceria e contribuição para o meu amadurecimento acadêmico e científico.

À equipe do Núcleo de Estudos em Ambiente e Bem-Estar Animal (NEAMBE/UFC), pelos equipamentos cedidos, pela orientação e pelo suporte no desenvolvimento do trabalho, especialmente ao Prof. Dr. José Antonio e à Dr^a. Simone Mendes.

Ao Dr. Gildas Tetaping, pela dedicação e auxílio na condução das análises de imunofluorescência, realizadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários de Microscopia Avançada (Celmma), da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

À minha família, que esteve presente ao longo de toda a minha trajetória, inclusive acadêmica, oferecendo apoio, incentivo e força constantes. Em especial, à minha mãe, Arnelda Mota, exemplo de esforço, fé e perseverança.

Ao meu namorado, Rodrigo Melo, e aos meus amigos, por serem refúgio e fonte de bem-estar, carinho e afeto ao longo dessa caminhada.

RESUMO

Este estudo investigou os efeitos do estresse térmico sobre respostas termorregulatórias e reprodutivas de ovinos deslanados, utilizando a insulação escrotal como modelo experimental. Sete carneiros adultos foram submetidos à insulação por sete dias consecutivos, em delineamento longitudinal composto por pré-insulação (4 semanas), insulação (1 semana) e pós-insulação (9 semanas). Realizaram-se quatro coletas seminais na fase pré e nove na fase pós-insulação, com monitoramento ambiental contínuo. Durante a insulação, os parâmetros termofisiológicos foram registrados após 24 h (D2) e 96 h (D4). O sêmen foi avaliado quanto à cinética por CASA, concentração, morfologia, integridade do DNA e padrão de ligação das *Ram Seminal Vesicle Proteins* (RSVPs) por imunocitoquímica. As variáveis reprodutivas foram analisadas pelo teste de Tukey, enquanto a termotolerância individual foi determinada por análise de componentes principais (PCA), com comparação entre grupos pelo teste de Kruskal–Wallis. A temperatura máxima registrada foi de 35,1 °C e a mínima de 25,8 °C. A umidade relativa variou entre 84,1% e 45,0%. A insulação elevou a temperatura da superfície escrotal em 0,75 °C e da cauda do epidídimo em 0,90 °C em relação à pré-insulação (33,25 °C e 31,75 °C), sem alterações na temperatura retal ou ocular. Os gradientes térmicos diminuíram durante a insulação, passando de 3,00 °C para 1,96 °C (ocular–escroto) e de 7,35 °C para 6,01 °C (retal–epidídimo), com restabelecimento após a retirada. A motilidade total diminuiu ($p < 0,05$) de $85,2 \pm 2,2\%$ para $40,6 \pm 13,6\%$ na segunda semana pós-insulação, atingindo $23,4 \pm 10,4\%$ na quarta semana, com recuperação na sexta ($67,7 \pm 6,2\%$; $p > 0,05$). A motilidade progressiva reduziu de $80,4 \pm 2,5\%$ para $38,3 \pm 13,2\%$ e $19,2 \pm 8,9\%$, retornando a $59,1 \pm 6,9\%$ na sexta semana. A circunferência escrotal variou de $30,3 \pm 0,7$ cm (pré) para $31,4 \pm 0,6$ cm ($p > 0,05$) e caiu para $28,6 \pm 0,5$ cm na terceira semana ($p < 0,05$). A morfologia normal passou de $89,9 \pm 4,2\%$ para $39,7 \pm 13,2\%$ na terceira semana, recuperando-se para $75,8 \pm 5,6\%$ na sétima ($p > 0,05$), enquanto defeitos maiores aumentaram de $4,9 \pm 2,3\%$ para $53,9 \pm 9,9\%$ na quinta semana. A integridade do DNA diminuiu de $92,9 \pm 1,5\%$ para $78,1 \pm 1,7\%$, atingindo $24,1 \pm 9,8\%$ na quarta semana, com recuperação para $88,1 \pm 1,4\%$ na sétima. A ligação das RSVPs caiu de $3,8 \pm 0,7 \times 10^6$ UA para $0,7 \pm 0,2 \times 10^6$ UA, normalizando-se na sétima semana. A PCA distinguiu grupos de baixa e alta termotolerância, sendo os animais HTT superiores ($p < 0,05$) em motilidade total ($73,6 \pm 2,7\%$ vs. $62,2 \pm 4,7\%$), progressiva ($68,2 \pm 2,9\%$ vs. $58,7 \pm 4,5\%$), concentração ($3,2 \pm 0,07 \times 10^9$ vs. $2,8 \pm 0,1 \times 10^9$ SPZs/mL) e integridade do DNA ($81,2 \pm 2,6\%$ vs. $70,2 \pm 4,4\%$). Conclui-se que sete dias de insulação escrotal comprometem a

termorregulação e induzem prejuízos reprodutivos, com respostas heterogêneas entre os animais, evidenciando variabilidade interindividual frente ao estresse térmico.

Palavras-chave: hipertermia escrotal; termorregulação; cinética espermática; integridade do DNA; interação proteína seminal–espermatozoide; termotolerância.

ABSTRACT

This study investigated the effects of heat stress on thermoregulatory and reproductive responses in hair sheep, using scrotal insulation as an experimental model. Seven adult rams were subjected to scrotal insulation for seven consecutive days in a longitudinal design consisting of pre-insulation (4 weeks), insulation (1 week), and post-insulation (9 weeks). Four semen collections were performed during the pre-insulation phase and nine during the post-insulation phase, with continuous environmental monitoring. During insulation, thermophysiological parameters were recorded after 24 h (D2) and 96 h (D4). Semen was evaluated for sperm kinetics by CASA, concentration, morphology, DNA integrity, and binding pattern of Ram Seminal Vesicle Proteins (RSVPs) by immunocytochemistry. Reproductive variables were analyzed using the Friedman test, while individual thermotolerance was determined by principal component analysis (PCA), with group comparisons performed using the Kruskal–Wallis test. The maximum recorded temperature was 35.1 °C and the minimum was 25.8 °C. Relative humidity ranged from 84.1% to 45.0%. Scrotal insulation increased scrotal surface temperature by 0.75 °C and epididymal tail temperature by 0.90 °C compared with pre-insulation values (33.25 °C and 31.75 °C), without changes in rectal or ocular temperature. Thermal gradients decreased during insulation, from 3.00 °C to 1.96 °C (ocular–scrotal) and from 7.35 °C to 6.01 °C (rectal–epididymal), with recovery after insulation removal. Total motility decreased ($p < 0.05$) from $85.2 \pm 2.2\%$ to $40.6 \pm 13.6\%$ in the second post-insulation week, reaching $23.4 \pm 10.4\%$ in the fourth week, with recovery by the sixth week ($67.7 \pm 6.2\%$; $p > 0.05$). Progressive motility declined from $80.4 \pm 2.5\%$ to $38.3 \pm 13.2\%$ and $19.2 \pm 8.9\%$, returning to $59.1 \pm 6.9\%$ in the sixth week. Scrotal circumference varied from 30.3 ± 0.7 cm (pre-insulation) to 31.4 ± 0.6 cm ($p > 0.05$) and decreased to 28.6 ± 0.5 cm in the third week ($p < 0.05$). Normal morphology dropped from $89.9 \pm 4.2\%$ to $39.7 \pm 13.2\%$ in the third week, recovering to $75.8 \pm 5.6\%$ in the seventh week ($p > 0.05$), while major defects increased from $4.9 \pm 2.3\%$ to $53.9 \pm 9.9\%$ in the fifth week. DNA integrity decreased from $92.9 \pm 1.5\%$ to $78.1 \pm 1.7\%$, reaching $24.1 \pm 9.8\%$ in the fourth week, with recovery to $88.1 \pm 1.4\%$ in the seventh week. RSVP binding intensity declined from $3.8 \pm 0.7 \times 10^6$ AU to $0.7 \pm 0.2 \times 10^6$ AU, normalizing by the seventh week. PCA distinguished low- and high-thermotolerance groups, with HTT animals showing higher ($p < 0.05$) total motility ($73.6 \pm 2.7\%$ vs. $62.2 \pm 4.7\%$), progressive motility ($68.2 \pm 2.9\%$ vs. $58.7 \pm 4.5\%$), concentration ($3.2 \pm 0.07 \times 10^9$ vs. $2.8 \pm 0.1 \times 10^9$ sperm/mL), and DNA integrity ($81.2 \pm 2.6\%$ vs. $70.2 \pm 4.4\%$). In conclusion, seven days of scrotal insulation impair thermoregulation and induce reproductive losses, with

heterogeneous responses among animals, highlighting interindividual variability under heat stress.

Keywords: scrotal hyperthermia; thermoregulation; sperm kinetics; DNA integrity; seminal protein–sperm interaction; thermotolerance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Delineamento experimental do estudo conduzido com ovinos Morada Nova (n = 7), dividido em três períodos: Período I – quatro semanas de coleta de dados basais antes da insulação escrotal; Período II – uma semana de estresse térmico escrotal induzido por bolsa de insulação; e Período III – nove semanas de acompanhamento pós-insulação para monitoramento da recuperação reprodutiva..... 9
- Figura 2 – Imagens termográficas de carneiros deslanados obtidas com câmera térmica infravermelha (FLIR® E5 Pro, USA). (A) Matriz utilizada para avaliação da temperatura do globo ocular (TOG), composta por uma área padronizada de 30 × 30 pixels. (B) Delineamento da área elíptica usada para avaliação da temperatura da superfície escrotal (TSST) (105 × 85 pixels). (C) Delineamento de duas áreas elípticas padronizadas utilizadas para avaliação da temperatura da cauda do epidídimo (STEP), cada uma medindo 22 × 22 pixels..... 11
- Figura 3 – Visão geral da variação da temperatura do microclima (°C; losangos azuis), da temperatura retal (°C; triângulos verdes), da temperatura da superfície escrotal (°C; quadrados vermelhos) e da temperatura do globo ocular (°C; asteriscos rosas) de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal ao longo do período experimental. As semanas -4 e -2 correspondem ao período pré-insulação (Fase I – controle); a insulação escrotal foi mantida por sete dias (semana 0; Fase II), com avaliações nos dias 2 (D2) e 4 (D4). No dia 8 (D8), as avaliações foram realizadas às 08:30, 09:00 e 09:30 h, imediatamente após a remoção da bolsa de insulação, para monitorar a recuperação da termorregulação escrotal. As semanas 1 a 9 correspondem ao período pós-insulação (Fase III). A temperatura do microclima foi monitorada continuamente apenas durante a insulação, enquanto as demais temperaturas foram avaliadas em horários fixos (08:00, 12:00 e 16:00 h). Os dados são apresentados de forma descritiva, sem análise estatística..... 18
- Figura 4 – Distribuição da temperatura do microclima térmico entre a bolsa de insulação e a pele escrotal de sete ovinos deslanados durante o período 19

de insulação. Cada boxplot representa, individualmente, a temperatura média semanal do microclima de cada animal (11, 13, 22, 44, 55, 66 e 88), registrada a cada 30 minutos ao longo dos sete dias de insulação (Semana 0), por meio do dispositivo iButton (Maxim®, Austrália).....

Figura 5 – Variação temporal das temperaturas corporais em carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal (N = 7): (A) temperatura retal (RT), (B) temperatura do globo ocular (TOG), (C) temperatura da superfície escrotal (TSST) e (D) temperatura da cauda do epidídimo (STEP). Cada ponto representa a média diária da respectiva temperatura, calculada a partir dos valores obtidos em três horários no mesmo dia (08:00, 12:00 e 16:00 h). As semanas -4 a -2 correspondem ao período pré-insulação (Fase I – controle); a insulação escrotal foi mantida por sete dias (Fase II), com avaliações nos dias 2 (D2) e 4 (D4); e as semanas 1 a 9 correspondem ao período pós-insulação (Fase III).....

Figura 6 – Imagens termográficas ilustrando a distribuição da temperatura da superfície escrotal em carneiros deslanados submetidos a estresse térmico moderado induzido por insulação escrotal (N = 7). As imagens correspondem a: (A) período pré-insulação (Fase I); (B) dia 2 de insulação escrotal (D2; Fase II); (C) dia 4 de insulação escrotal (D4; Fase II); e (D) uma semana após a remoção da bolsa insuladora, correspondente ao período pós-insulação (Fase III). Todas as imagens foram corrigidas pela temperatura do ar ambiente e pela umidade relativa medidas no local experimental.....

Figura 7 – Gradientes térmicos entre a temperatura do globo ocular (TOG), a temperatura da superfície escrotal (TSST), a temperatura retal (RT) e a temperatura da cauda do epidídimo (STEP) em ovinos deslanados submetidos à insulação escrotal (N = 7): (A) TOG-TSST, (B) TOG-STEP, (C) RT-TSST e (D) RT-STEP. As diferenças entre as variáveis apresentadas nos eixos correspondem aos respectivos gradientes térmicos (°C). As semanas -4 a -2 correspondem ao período pré-insulação (Fase I – controle); a insulação escrotal foi mantida por sete dias (Fase II), com avaliações nos dias 2 (D2) e 4 (D4); e as semanas 1 a 9 correspondem ao período pós-insulação (Fase III).....

- Figura 8 – Motilidade espermática total (A), motilidade progressiva (B), 24
concentração espermática (C) e circunferência escrotal (D) de carneiros
deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1
correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9
ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias
(semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm
EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas,
de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).....
- Figura 9 – Velocidade curvilínea (VCL) (A), motilidade circular (B) e 25
espermatozoides imóveis (C) de carneiros deslanados submetidos à
insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-
insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A
insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os
valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras
diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com
o teste de Tukey ($p < 0,05$).....
- Figura 10 – Velocidade em linha reta (VSL) (A), velocidade média do trajeto (VAP) 26
(B), distância curvilínea percorrida (DCL) (C) e distância em linha reta
(DSL) (D) dos espermatozoides de carneiros deslanados submetidos à
insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-
insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A
insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os
valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras
diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com
o teste de Tukey ($p < 0,05$).....
- Figura 11 – Distância média do trajeto (DAP) (A), motilidade local (B), 27
motilidade rápida (C) e motilidade lenta (D) dos espermatozoides de carneiros
deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1
correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9
ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias
(semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm
EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas,
de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).....

- Figura 12 – Viabilidade espermática (A), espermatozoides normais (B), defeitos maiores (C) e defeitos menores (D) de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 28
- Figura 13 – Defeitos acrossômicos (A), gota citoplasmática proximal (B), cauda enrolada ao redor da cabeça (C), defeitos de peça intermediária (D), cabeça isolada patológica (E) e cauda fortemente enrolada ou dobrada (F) dos espermatozoides de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 29
- Figura 14 – Integridade do DNA espermático de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 30
- Figura 15 – Intensidade média de fluorescência (FITC) da ligação das *Ram Seminal Vesicle Protein* (RSVPs) aos espermatozoides de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 31
- Figura 16 – Classificação de carneiros deslanados em fenótipos de alta (HTT, $n = 3$) e baixa (LTT, $n = 4$) termotolerância por análise de componentes principais (PCA), com base em parâmetros reprodutivos da quarta 32

semana pós-insulação. Os dois primeiros componentes principais explicam 78,0% da variância total (58,0% e 20,2%, respectivamente)....

- Figura 17 – Parâmetros espermáticos de carneiros deslanados classificados em alta 33
(HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância. As médias foram estimadas por modelos mistos considerando todas as semanas do estudo, devido à ausência de interação significativa entre semana e grupo ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Resultados expressos como média \pm EPM.....
- Figura 18 – Parâmetros espermáticos de carneiros deslanados classificados em alta 34
(HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância. As médias foram estimadas por modelos mistos considerando todas as semanas do estudo, devido à ausência de interação significativa entre semana e grupo ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Resultados expressos como média \pm EPM.....
- Figura 19 – Parâmetros espermáticos de carneiros deslanados classificados em alta 35
(HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância. As médias foram estimadas por modelos mistos considerando todas as semanas do estudo, devido à ausência de interação significativa entre semana e grupo ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Resultados expressos como média \pm EPM.....
- Figura 20 – Variáveis e gradientes térmicos de carneiros deslanados com alta (HTT, 37
n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância após sete dias de insulação escrotal. São apresentadas as seguintes variáveis: (A) temperatura retal (RT), (B) temperatura do globo ocular (TOG), (C) temperatura da superfície escrotal (TSST), (D) temperatura da cauda do epidídimo (STEP), e os gradientes térmicos (E) TOG–TSST, (F) TOG–STEP, (G) RT–TSST e (H) RT–STEP. Os valores representam médias obtidas nos dias 2 (D2) e 4 (D4) da insulação escrotal (Fase II), e as diferenças indicadas acima das barras representam apenas diferenças entre médias (LTT – HTT), sem análise estatística inferencial.....

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 — Variáveis ambientais registradas durante o período experimental, incluindo temperatura do ar (°C) e umidade relativa (%), avaliadas conforme o período do dia (manhã, tarde e noite). Os valores representam médias semanais. As semanas -4 a -2 correspondem à Fase I (controle), a insulação escrotal de sete dias à Fase II (semana 0), e as semanas 1 a 9 à Fase III..... 16
- Tabela 2 — Variação temporal das temperaturas corporais e dos gradientes térmicos em carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal (N = 7). As temperaturas corporais incluem temperatura retal (RT), do globo ocular (TOG), da superfície escrotal (TSST) e da cauda do epidídimo (STEP), bem como os gradientes térmicos TOG-TSST, TOG-STEP, RT-TSST e RT-STEP. Os valores representam médias diárias calculadas a partir de três horários de avaliação (08:00, 12:00 e 16:00 h). As semanas -4 a -2 correspondem ao período pré-insulação (Fase I – controle), os dias 2 (D2) e 4 (D4) ao período de insulação (Fase II), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação (Fase III)..... 19
- Tabela 3 — Variáveis e gradientes térmicos de carneiros deslanados com alta (HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância após sete dias de insulação escrotal. As variáveis incluem temperatura retal (RT), do globo ocular (TOG), da superfície escrotal (TSST) e da cauda do epidídimo (STEP), bem como os gradientes térmicos TOG-TSST, TOG-STEP, RT-TSST e RT-STEP. Os valores representam médias obtidas nos dias 2 (D2) e 4 (D4) da insulação escrotal (Fase II)..... 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aw	Clima tropical com estação seca (classificação de Köppen)
BSA	Albumina sérica bovina
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CEUAP	Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção
CYP17	Citocromo P450, família 17
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAP	Distância média de percurso
DCL	Distância curvilínea percorrida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSL	Distância em linha reta
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCl	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
IS	Espermatozoides imóveis
LH	Hormônio luteinizante
MC	Motilidade circular
ML	Motilidade lenta
MLOC	Motilidade local
MP	Motilidade progressiva
MR	Motilidade rápida
MSX	<i>Multi Spectral Dynamic Imaging</i>
MT	Motilidade total
NA	Agarose normal
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween-20
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PFA	Paraformaldeído

IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
ROIs	Regiões de interesse
RSVPs	<i>Ram Seminal Vesicle Proteins</i>
RT–STEP	Gradiente térmico entre temperatura retal e temperatura da cauda do epidídimo
RT–TSST	Gradiente térmico entre temperatura retal e temperatura da superfície escrotal
SCD	<i>Sperm Chromatin Dispersion</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPZs	Espermatozoides
STEP	Temperatura da superfície da cauda do epidídimo
StAR	Proteína reguladora aguda da esteroidogênese
STRA8	<i>Stimulated by Retinoic Acid 8</i>
TOG	Temperatura do globo ocular
TOG–STEP	Gradiente térmico entre temperatura do globo ocular e temperatura da cauda do epidídimo
TOG–TSST	Gradiente térmico entre temperatura do globo ocular e temperatura da superfície escrotal
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano tamponado com ácido clorídrico
TSST	Temperatura da superfície escrotal
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAP	Velocidade média de percurso
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
kg	Quilograma
×	Multipliação
min	Minuto
h	Hora
s	Segundo
m	Metro
cm	Centímetro
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μm	Micrômetro
μm ²	Micrômetro quadrado
μm/s	Micrômetro por segundo
nm	Nanômetro
M	Molar
mg/mL	Miligrama por mililitro
v/v	Volume por volume
β	Letra grega beta
Δ	Diferença (delta)
UA	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Sensibilidade da função reprodutiva masculina ao estresse térmico	4
2.2	Mecanismos de termorregulação escrotal e manutenção da temperatura testicular	5
2.3	Hipertermia testicular: estresse oxidativo e danos celulares associados	6
2.4	Estresse térmico: alterações reprodutivas e endócrinas	7
2.5	Zootecnia de precisão aplicada ao monitoramento termofisiológico e reprodutivo	8
2.6	Insulação escrotal como modelo experimental de indução de estresse térmico testicular ...	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Ética	11
3.2	Local do experimento, animais e manejo	11
3.3	Delineamento experimental	11
3.4	Caracterização ambiental e parâmetros termofisiológicos	12
3.4.1	<i>Variáveis ambientais</i>	12
3.4.2	<i>Avaliação da temperatura do microclima entre a bolsa de insulação e a pele escrotal</i>	13
3.4.3	<i>Coleta de dados termofisiológicos</i>	13
3.5	Parâmetros reprodutivos e qualidade	14
3.5.1	<i>Coleta de sêmen</i>	14
3.5.2	<i>Cinética espermática</i>	15
3.5.3	<i>Concentração espermática</i>	15
3.5.4	<i>Viabilidade e morfologia espermática</i>	15
3.5.5	<i>Integridade do DNA espermático</i>	16
3.5.6	<i>Dinâmica da ligação das Ram Seminal Vesicle Proteins (RSVPs)</i>	16
3.6	Análise estatística	18
4	RESULTADOS	19
4.1	Variáveis ambientais	19
4.2	Temperaturas corporais e do microambiente escrotal sob o dispositivo de insulação	19
4.3	Respostas termofisiológicas	21
4.4	Gradientes térmicos	24
4.5	Cinética espermática	25
4.6	Concentração espermática e circunferência escrotal	28

4.7	Morfologia e viabilidade espermática.....	29
4.8	Integridade do DNA espermático.....	31
4.9	Padrão de ligação das RSVPs aos espermatozoides.....	32
4.10	Caracterização de grupos de carneiros com diferentes perfis de termotolerância.....	33
5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Ovinos da raça Morada Nova apresentam elevada adaptabilidade a condições adversas de temperatura e umidade, com eficiente dissipação de calor e bom desempenho em ambientes áridos e tropicais (KAHWAGE et al., 2017; FONSÊCA et al., 2019). Essa adaptabilidade ao estresse térmico está associada a características fenotípicas, incluindo coloração do pelame, reduzido comprimento e baixa densidade dos pelos, menor espessura da pele, maior área corporal exposta e fenótipo deslanado (SEIXAS et al., 2016; LEITE et al., 2018). Apesar dessa adaptabilidade, esses animais não estão totalmente isentos dos efeitos do estresse térmico (SILVA et al., 2016; VIANA NETO et al., 2024), reforçando a necessidade de investigações integradas, particularmente em reprodutores, especialmente para elucidar como a elevação da temperatura testicular compromete a termorregulação escrotal e o desempenho reprodutivo dos machos dessa raça.

Mecanismos fisiológicos, como o aumento da frequência respiratória, a redistribuição do fluxo sanguíneo periférico e a intensificação da sudorese, são ativados na tentativa de restabelecer a homeostase térmica (HALES et al., 1987; HE et al., 2024). No escroto e nos testículos, estruturas como os músculos da túnica dartos e o músculo cremaster, o plexo pampiniforme e a superfície escrotal atuam de forma integrada para manter a temperatura testicular dentro de limites fisiológicos (AHMAD PARA et al., 2020; BEN MOULA et al., 2024). O monitoramento de respostas termofisiológicas, como temperaturas retal e escrotal, perda de calor por via respiratória e outros parâmetros, constitui ferramenta essencial para avaliar o conforto térmico e orientar estratégias de manejo, sobretudo em regiões desafiadoras como o semiárido tropical brasileiro (GONÇALVES et al., 2021; MASCARENHAS et al., 2023; FERREIRA; ANDRADE; FERREIRA, 2024).

Sob condições de estresse térmico intenso, a elevação da temperatura escrotal pode comprometer o gradiente térmico essencial à espermatogênese (MENEGASSI et al., 2018; GONÇALVES et al., 2021), que requer uma temperatura testicular de 2 a 6 °C inferior à corporal (KASTELIC et al., 1996). Estudos apontam que o estresse térmico eleva a temperatura em diferentes regiões do escroto (proximal, medial e distal), reduzindo o gradiente térmico testicular e elevando a incidência de anormalidades espermáticas (AHIRWAR et al., 2018; VIEIRA NETO et al., 2021). A hipertermia testicular promove desequilíbrios bioquímicos, como o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que intensificam processos apoptóticos no epitélio seminífero, reduzem a viabilidade espermática e prejudicam a fertilidade (ESCOBAR et al., 2019; MOHAMED et al., 2023). Em ovinos, o estresse térmico

testicular causa alterações na morfologia, fragmentação do DNA, perda da integridade de membranas plasmática e mitocondrial, além de redução da motilidade espermática (ROCHA et al., 2015; CRUZ JÚNIOR et al., 2015; VIANA NETO et al., 2024).

Os efeitos do estresse térmico sobre a atividade reprodutiva de animais domésticos têm sido amplamente investigados por meio do modelo experimental de insulação escrotal (ROCHA et al., 2015; ALVES et al., 2021; VIANA NETO et al., 2024). Esse modelo constitui uma abordagem experimental economicamente viável e eficaz para elevar a temperatura testicular de forma controlada, permitindo a avaliação específica das respostas reprodutivas ao calor, minimizando interferências em outros sistemas fisiológicos. Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstram que carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias consecutivos apresentaram prejuízos à função testicular, alterações nos parâmetros espermáticos e mudanças no proteoma do plasma seminal (ROCHA et al., 2015). Mais recentemente, nossos achados também confirmaram danos às características espermáticas, incluindo fragmentação do DNA, alterações no padrão de ligação das *Ram Seminal Vesicle Proteins* (RSVPs) e impactos na composição do plasma seminal de ovinos após quatro noites de insulação escrotal (VIANA NETO et al., 2024).

A exposição ao calor ativa o eixo hipotálamo–hipófise–adrenal, elevando os níveis de cortisol, que suprimem a liberação de GnRH e, conseqüentemente, a secreção de FSH e LH, hormônios essenciais para a função das células de Sertoli e de Leydig (TORT; TELES, 2011; YANG et al., 2020). As células de Sertoli sustentam o desenvolvimento e a sobrevivência dos espermatozoides, enquanto as de Leydig sintetizam testosterona por meio da proteína StAR, cuja expressão é reduzida sob estresse térmico, podendo comprometer a esteroidogênese (LI et al., 2016; RIZZOTO et al., 2020). A hipertermia testicular também diminui a produção intratesticular de progesterona (KIM et al., 2016) e de hormônio antimülleriano pelas células de Sertoli adultas (FERRER et al., 2022), além de alterar a expressão dos componentes do sistema inibina–ativina e modificar os níveis de ativinas A e B durante o período de recuperação pós-estresse (ALDAHAN et al., 2019). Esses efeitos são reflexos de danos funcionais e estruturais em células de Sertoli e Leydig, que sofrem redução de tamanho e aumento de apoptose devido ao estresse oxidativo induzido pelo calor (ZHANG et al., 2020; WEN et al., 2025).

Nesse sentido, a termorregulação escrotal representa um dos mecanismos fisiológicos mais críticos para a manutenção da fertilidade masculina em mamíferos, especialmente devido à alta sensibilidade da espermatogênese a elevações de temperatura (TEIXEIRA et al., 2025; WEN et al., 2025). A vulnerabilidade da termorregulação escrotal

tende a se intensificar no contexto das mudanças climáticas globais. Segundo projeções do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), espera-se um aumento da temperatura média global entre 1,5 e 3,2 °C nas próximas décadas (IPCC, 2023), o que pode intensificar os desafios à homeostase térmica testicular. Nesse contexto, é relevante compreender como o estresse por calor afeta as respostas fisiológicas de ovinos deslanados, como a raça Morada Nova, reconhecida por sua adaptabilidade a ambientes semiáridos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar as alterações termofisiológicas e reprodutivas de ovinos da raça Morada Nova submetidos ao modelo experimental de estresse térmico induzido por insulação escrotal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sensibilidade da função reprodutiva masculina ao estresse térmico

Diante da intensificação das mudanças climáticas e o consequente aumento das temperaturas globais, torna-se essencial compreender de que forma essas alterações ambientais podem comprometer os sistemas de produção animal (ALLEN et al., 2015; CHATTEN et al., 2025). Nesse cenário, eventos climáticos extremos, como ondas de calor, caracterizadas por períodos consecutivos de temperaturas persistentemente elevadas acima dos padrões regionais, tendem a se tornar mais frequentes e intensos, representando um desafio crescente à capacidade termorregulatória dos animais e à manutenção da homeostase (IPCC, 2021). Essa problemática assume especial relevância em regiões tropicais e semiáridas, como o Nordeste brasileiro, onde as condições ambientais já impõem restrições térmicas significativas ao desempenho fisiológico e reprodutivo (FERREIRA; ANDRADE; FERREIRA, 2024).

Evidências experimentais demonstram que animais expostos à hipertermia ativam mecanismos compensatórios para dissipação de calor, incluindo aumento da frequência respiratória e da sudorese (PEREIRA et al., 2020; WALLAGE et al., 2022). Em búfalos submetidos a condições simuladas de ondas de calor, por exemplo, observou-se intensificação das respostas termorregulatórias, com relativa estabilidade de parâmetros hematológicos, sugerindo certo grau de resiliência fisiológica em animais adaptados a ambientes quentes (PEREIRA et al., 2020). Entretanto, embora tais mecanismos contribuam para a manutenção do equilíbrio sistêmico, ainda não está completamente elucidado o impacto da hipertermia sobre a função reprodutiva masculina no contexto das mudanças climáticas.

A reprodução constitui um dos processos biológicos mais sensíveis às variações térmicas (AHIRWAR et al., 2018; WALLAGE et al., 2021; WEN et al., 2025), de modo que a manutenção da eficiência reprodutiva dos rebanhos nas próximas décadas representa um desafio crítico para a pecuária em ambientes quentes. Nos machos, a função testicular normal depende da manutenção da temperatura gonadal geralmente entre 2 e 6 °C abaixo da temperatura corporal, condição essencial para a espermatogênese, a produção hormonal e a fertilidade (KASTELIC et al., 1996; ALVES et al., 2016; MENEGASSI et al., 2018). Assim, mesmo elevações discretas na temperatura corporal ou testicular podem comprometer a libido, a esteroidogênese, a qualidade dos gametas e o potencial fertilizante dos reprodutores (ALVES et al., 2016; VIANA NETO et al., 2024).

Dessa forma, estudos que investiguem os efeitos da elevação térmica sobre respostas fisiológicas, particularmente reprodutivas, tornam-se essenciais para compreender

como o estresse térmico projetado para as próximas décadas poderá afetar a fertilidade animal (KHAN et al., 2023). Esse conhecimento contribui tanto para o desenvolvimento de estratégias de mitigação dos impactos do calor (ZHANG et al., 2020; SONG et al., 2022; NASRELDEEN et al., 2025) quanto para o avanço de programas de seleção de animais com maior capacidade de termotolerância, o que pode favorecer a sustentabilidade dos sistemas pecuários em ambientes desafiadores.

2.2 Mecanismos de termorregulação escrotal e manutenção da temperatura testicular

Modelos naturais ou artificiais de estresse térmico impõem desafios à capacidade termorregulatória escrotal (RODRIGUES et al., 2023). Nessas condições, os animais ativam respostas fisiológicas para restabelecer a homeotermia; contudo, quando esses mecanismos tornam-se insuficientes, instala-se a hipertermia (PEREIRA et al., 2020), caracterizada pela elevação da temperatura corporal interna, frequentemente acompanhada por aumento da temperatura testicular (SILVA et al., 2018; WALLAGE et al., 2021; BARRAGÁN et al., 2023). O estresse por calor compromete inicialmente estruturas responsáveis pela regulação térmica escrotal, incluindo a túnica dartos, o músculo cremáster, o plexo pampiniforme, a superfície escrotal e as glândulas sudoríparas locais (AHMAD et al., 2012; AHMAD PARA et al., 2020; KASTELIC et al., 2021).

A manutenção da temperatura testicular abaixo da corporal depende da integração de mecanismos anatômicos e fisiológicos que garantem um microclima escrotal adequado à espermatogênese. A túnica dartos e o músculo cremáster regulam o posicionamento testicular em relação ao corpo, enquanto o plexo pampiniforme exerce papel central na troca de calor em contracorrente entre o sangue arterial e venoso, permitindo o resfriamento eficiente do sangue que chega às gônadas (KASTELIC et al., 1996). Adicionalmente, a pele escrotal delgada e rica em glândulas sudoríparas favorece a dissipação térmica por condução, radiação e evaporação, contribuindo para a estabilidade térmica gonadal (KASTELIC; RIZZOTO; THUNDATHIL, 2018). Como resultado, estabelece-se um gradiente térmico fisiológico ao longo do escroto, com temperaturas progressivamente menores da porção proximal para a distal, especialmente na região da cauda do epidídimo (VIEIRA NETO et al., 2021). Esse gradiente é fundamental para a manutenção da espermatogênese e da integridade das células germinativas (KASTELIC; RIZZOTO; THUNDATHIL, 2018).

Entretanto, quando a carga térmica excede a capacidade compensatória desses mecanismos, ocorre perda da eficiência termorregulatória e instalação da hipertermia escrotal. Nessa condição, observa-se aumento homogêneo da temperatura testicular, redução ou

eliminação do gradiente térmico fisiológico e comprometimento direto da função gonadal, com impactos negativos sobre a espermatogênese e a qualidade espermática (ALVES et al., 2016; VIEIRA NETO et al., 2021; VIANA NETO et al., 2024).

2.3 Hipertermia testicular: estresse oxidativo e danos celulares associados

A elevação da temperatura testicular desencadeia alterações celulares e moleculares que comprometem diretamente a função reprodutiva masculina, destacando-se o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e o consequente desequilíbrio redox no tecido gonadal (KANTER; AKTAS; ERBOGA, 2013). Embora espécies reativas sejam produzidas fisiologicamente, o estresse térmico intensifica sua geração, favorecendo a instalação do estresse oxidativo e a perda da homeostase celular (PAUL et al., 2008; APRIOKU, 2013).

As células germinativas apresentam elevada sensibilidade a esse desequilíbrio devido à intensa atividade metabólica e à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas espermáticas, o que torna as estruturas celulares altamente suscetíveis à peroxidação lipídica (AITKEN et al., 2016; COLLODEL et al., 2022). Esse processo compromete a integridade da membrana plasmática e gera subprodutos tóxicos, como o malondialdeído, capaz de interagir com componentes celulares, incluindo o DNA (MARNETT, 1999). Como consequência, ocorrem prejuízos funcionais relevantes, como redução da motilidade espermática, alterações na integridade acrossomal e comprometimento da capacidade fertilizante (ALVES et al., 2016; ALVES et al., 2021; WEN et al., 2025).

Além dos danos de membrana (ALVES et al., 2021), a hipertermia promove alterações em organelas essenciais. A mitocôndria espermática apresenta disfunção associada ao aumento do estresse oxidativo, enquanto o acrossoma pode sofrer alterações estruturais que comprometem etapas fundamentais da fertilização (ALVES et al., 2016; GARCIA-OLIVEROS et al., 2022). Paralelamente, o DNA espermático constitui alvo importante das espécies reativas de oxigênio, podendo apresentar quebras e modificações que reduzem a qualidade genética dos gametas (SONG et al., 2022). O estresse térmico também afeta células somáticas testiculares, como as células de Sertoli e de Leydig, essenciais para o suporte estrutural e endócrino da espermatogênese. Alterações nessas células resultam em prejuízos ao microambiente seminífero, disfunção esteroidogênica e redução da produção de testosterona (MOEINIAN et al., 2024). Modelos experimentais demonstram alterações morfológicas nas células de Leydig associadas à redução da expressão de proteínas esteroidogênicas, como CYP17 e StAR, indicando comprometimento funcional do tecido testicular (LI et al., 2016; MOEINIAN et al., 2024; WEN et al., 2025). Em situações mais severas ou prolongadas, o acúmulo de danos

oxidativos pode levar à degeneração do epitélio seminífero e à ativação de mecanismos de apoptose, contribuindo para a redução da produção espermática e para o comprometimento da fertilidade masculina.

2.4 Estresse térmico: alterações reprodutivas e endócrinas

O estresse térmico testicular promove alterações estruturais, funcionais e moleculares que repercutem diretamente na qualidade espermática (ALVES et al., 2021; VIANA NETO et al., 2024). O aumento de espécies reativas de oxigênio supera a capacidade antioxidante do tecido gonadal, resultando em danos aos espermatozoides presentes no epidídimo e às células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento (TEIXEIRA et al., 2025). Essas alterações incluem modificações na motilidade, na integridade das membranas plasmática e acrossomal, na morfologia e no potencial de membrana mitocondrial dos gametas masculinos (ALVES et al., 2021; VIANA NETO et al., 2024; TEIXEIRA et al., 2025).

Elevações de aproximadamente 5 °C na temperatura escrotal podem reduzir o peso testicular e o diâmetro dos túbulos seminíferos, além de comprometer rapidamente a qualidade espermática epididimária, com redução dos parâmetros cinéticos e aumento das anormalidades morfológicas (TEIXEIRA et al., 2025). Em carneiros Morada Nova submetidos à insulação escrotal por oito dias, observou-se redução progressiva da proporção de espermatozoides morfolologicamente normais, de cerca de 92% para 39%, com recuperação completa apenas após aproximadamente 106 dias, evidenciando o caráter prolongado dos efeitos térmicos sobre a espermatogênese (ROCHA et al., 2015). Resultados semelhantes têm sido descritos em bovinos e ovinos submetidos a diferentes períodos de insulação escrotal (BARTH; BOWMAN, 1994; KASTELIC et al., 2017; VIANA NETO et al., 2024).

Além dos impactos morfológicos sobre o tecido testicular, o estresse térmico compromete de forma significativa a função endócrina reprodutiva, especialmente a biossíntese de testosterona (ALVES et al., 2016; RIZZOTO et al., 2020). A exposição ao calor ativa o eixo hipotálamo–hipófise–adrenal, o que pode elevar os níveis de cortisol e suprimir a liberação de GnRH e, consequentemente, reduzir a secreção de FSH e LH, hormônios essenciais para a regulação funcional das células de Sertoli e de Leydig (TORT; TELES, 2011; YANG et al., 2020). Modelos experimentais demonstram que a hipertermia está associada à redução do número e do tamanho dessas células, ao aumento da apoptose e ao comprometimento da esteroidogênese, incluindo diminuição da expressão de proteínas fundamentais, como a StAR, além da redução dos níveis hormonais circulantes e intratesticulares (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2020; WEN et al., 2025). Paralelamente, observa-se menor expressão de genes

relacionados à proliferação e à diferenciação germinativa, como *c-kit*, *STRA8* e *PCNA*, indicando prejuízos diretos à dinâmica espermatogênica (MOEINIAN et al., 2024; WEN et al., 2025). Alterações adicionais incluem diminuição da produção intratesticular de progesterona, redução do hormônio antimülleriano em células de Sertoli adultas e modificações na expressão dos componentes do sistema inibina–ativina durante o período de recuperação pós-estresse (KIM et al., 2016; ALDAHAN et al., 2019; FERRER et al., 2022). Em conjunto, essas alterações comprometem significativamente a capacidade reprodutiva, considerando o papel central das células de Sertoli no suporte ao desenvolvimento das células germinativas e das células de Leydig na manutenção do ambiente hormonal necessário à espermatogênese e à fertilidade masculina (RUTHIG; LAMB, 2022).

2.5 Zootecnia de precisão aplicada ao monitoramento termofisiológico e reprodutivo

A zootecnia de precisão fundamenta-se no uso de tecnologias digitais e sensores capazes de realizar o monitoramento contínuo, individualizado e em tempo real de variáveis ambientais, fisiológicas, comportamentais e produtivas, permitindo a compreensão integrada das respostas biológicas dos animais frente aos desafios ambientais (LI et al., 2020). Essa abordagem possibilita a identificação precoce de alterações fisiológicas, a caracterização da variabilidade individual na capacidade adaptativa e a tomada de decisões baseada em dados objetivos, contribuindo para sistemas produtivos mais eficientes e sustentáveis (ROSA, 2021).

No contexto do estresse térmico, o monitoramento ambiental constitui etapa fundamental para a quantificação da carga térmica imposta ao organismo, uma vez que fatores meteorológicos como temperatura do ar, umidade relativa, radiação solar e velocidade do vento determinam o balanço térmico animal e influenciam diretamente sua capacidade de dissipação de calor (MADER; DAVIS; BROWN-BRANDL, 2006; WANG et al., 2018). Nesse sentido, o uso de dataloggers possibilita o registro contínuo dessas condições, o que pode favorecer o cálculo de índices bioclimáticos e a caracterização precisa do microclima, enquanto a obtenção de dados em alta resolução temporal permite compreender a magnitude e a duração da exposição térmica e estabelecer relações mais consistentes entre o ambiente e as respostas fisiológicas e produtivas (GONÇALVES et al., 2021). Adicionalmente, sensores miniaturizados de temperatura, como dispositivos do tipo iButton®, têm sido empregados em estudos fisiológicos para o monitoramento contínuo da temperatura ambiental ou corporal em diferentes regiões anatômicas, proporcionando elevada resolução temporal na avaliação da exposição térmica (WALLAGE et al., 2022; SILVA et al., 2023b). A integração dessas informações com parâmetros fisiológicos contribui para a compreensão dos limites de

tolerância térmica, dos mecanismos de adaptação ao calor e dos impactos do ambiente sobre o desempenho produtivo e reprodutivo.

Entre as tecnologias aplicadas ao monitoramento termofisiológico, destaca-se a termografia infravermelha, uma ferramenta não invasiva capaz de mensurar a temperatura superficial corporal a partir da radiação emitida pelos tecidos (AHIRWAR et al., 2018; MENEGASSI et al., 2018). Regiões anatômicas como a área ocular, o pavilhão auricular e o escroto apresentam elevada vascularização e rápida resposta às alterações circulatórias periféricas, o que pode refletir mudanças na perfusão sanguínea e nos mecanismos de dissipação de calor (STEWART et al., 2007). Dessa forma, a termografia tem sido amplamente utilizada como indicador indireto da homeostase térmica, do estado de bem-estar e da eficiência da termorregulação testicular, apresentando elevado potencial para aplicação em estudos reprodutivos (ALVES et al., 2016; MENEGASSI et al., 2018; VIEIRA NETO et al., 2021).

2.6 Insulação escrotal como modelo experimental de indução de estresse térmico testicular

A insulação escrotal constitui um modelo experimental amplamente utilizado para indução controlada de hipertermia testicular, promovendo elevação localizada da temperatura das gônadas sem repercussões sistêmicas relevantes (ALVES et al., 2016; VIANA NETO et al., 2024). O aumento térmico no microambiente escrotal compromete diretamente a espermatogênese, uma vez que a produção espermática depende da manutenção da temperatura testicular abaixo da corporal (KASTELIC et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2025).

Entre as principais vantagens desse modelo destacam-se a aplicação de estímulo térmico localizado, reprodutível e padronizável, o que permite controle da intensidade e da duração da exposição ao calor (ROCHA et al., 2015; ALVES et al., 2016). A magnitude das alterações depende da severidade do insulto térmico, podendo variar desde alterações funcionais transitórias até degeneração seminífera mais acentuada (ROCHA et al., 2015; ALVES et al., 2016). Estudos experimentais demonstram a dinâmica temporal dos efeitos da hipertermia sobre a função testicular, incluindo redução da circunferência escrotal, comprometimento da qualidade seminal e ocorrência de azoospermia transitória, seguida de recuperação associada à renovação da espermatogênese (ROCHA et al., 2015; VIANA NETO et al., 2024). Esses achados evidenciam que os danos térmicos apresentam caráter reversível, porém dependente do tempo necessário para reorganização do epitélio seminífero. Avanços recentes indicam que os efeitos do calor não se restringem às alterações espermáticas clássicas, envolvendo também modificações moleculares no ambiente seminal. Alterações no proteoma do plasma seminal, incluindo proteínas relacionadas à proteção celular e ao potencial

fertilizante, demonstram que o estresse térmico afeta mecanismos bioquímicos essenciais à funcionalidade espermática (ROCHA et al., 2015; VIANA NETO et al., 2024).

Em conjunto, esses achados consolidam a insulação escrotal como ferramenta experimental robusta para investigação dos mecanismos celulares e moleculares associados à hipertermia testicular, permitindo compreender a progressão temporal dos danos reprodutivos induzidos pelo calor e suas implicações sobre a fertilidade masculina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

O experimento foi conduzido em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o protocolo aprovado nº 1012202401.

3.2 Local do experimento, animais e manejo

O estudo foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizado no município de Fortaleza, Ceará (3°45'02'' S; 38°32'35'' O), na região Nordeste do Brasil. O clima local é tropical Aw, segundo a classificação climática de Köppen (1936), caracterizado por uma estação seca bem definida. A pesquisa foi conduzida durante a estação seca, entre julho e setembro de 2025.

Foram utilizados sete carneiros adultos da raça Morada Nova, variedade branca, com peso corporal médio de $47,0 \pm 3,7$ kg e idade aproximada de 18 meses. Os animais eram clinicamente saudáveis e tiveram sua condição geral e integridade física monitoradas pelo médico-veterinário responsável do Departamento de Zootecnia/UFC. Todos apresentavam atividade reprodutiva dentro dos padrões fisiológicos da espécie, conforme os critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

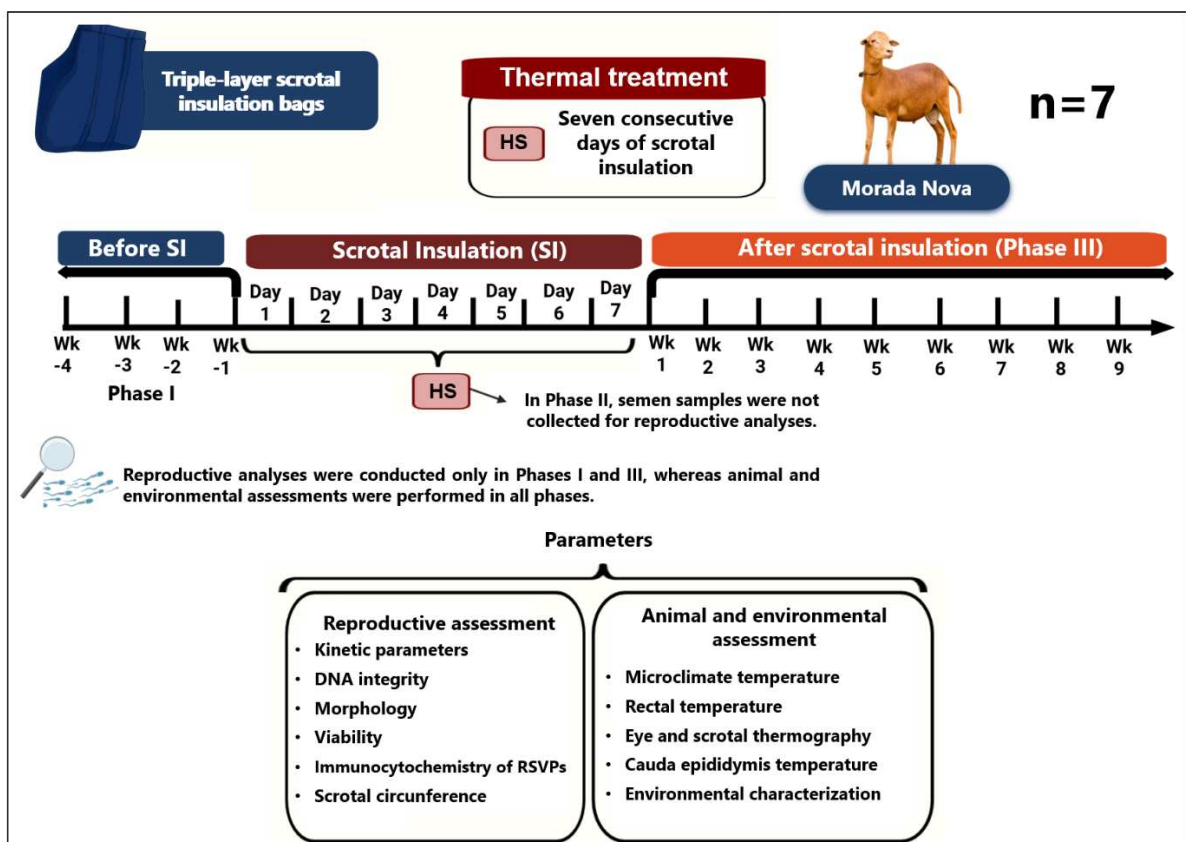
Os carneiros foram alojados em duas baias coletivas, posicionadas lado a lado. Os animais receberam dieta de crescimento, compatível com sua fase fisiológica, composta por feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) como volumoso e concentrado contendo 15% de proteína bruta, formulado à base de milho, farelo de soja e suplemento mineral. A dieta foi balanceada para atender às exigências nutricionais recomendadas pelo BR Caprinos e Ovinos (2024). A água foi fornecida *ad libitum*. Os animais passaram por um período de adaptação de duas semanas às instalações e às condições de manejo experimental antes do início das coletas.

3.3 Delineamento experimental

O experimento foi um delineamento longitudinal, dividido em três fases: (I) pré-insulação escrotal, (II) insulação escrotal e (III) pós-insulação escrotal. A Fase I teve duração de quatro semanas, período no qual foram realizadas coletas semanais de sêmen e avaliações termofisiológicas quinzenais, com o objetivo de estabelecer os valores de referência dos animais. Na Fase II, os carneiros foram submetidos a insulação escrotal durante 7 dias (1 semana), usando bolsa de insulação composta por três camadas: poliéster (externa), espuma

(intermediária) e algodão (interna), posicionadas sobre o escroto. Nesta Fase II, foram registradas as temperaturas retal, escrotal e ocular dos animais, além das variáveis ambientais. Na Fase III, após a retirada da bolsa de insulação, os animais foram monitorados semanalmente, ao longo de nove semanas, para avaliação da recuperação dos parâmetros reprodutivos, e quinzenalmente para a avaliação das variáveis térmicas (Figura 1).

Figura 1 — Delineamento experimental do estudo conduzido com ovinos Morada Nova ($n = 7$), dividido em três períodos: Período I – quatro semanas de coleta de dados basais antes da insulação escrotal; Período II – uma semana de estresse térmico escrotal induzido por bolsa de insulação; e Período III – nove semanas de acompanhamento pós-insulação para monitoramento da recuperação reprodutiva.



3.4 Caracterização ambiental e parâmetros termofisiológicos

3.4.1 Variáveis ambientais

A temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa (%) do ambiente do experimento foram monitoradas por dois dataloggers (HOBO U23-001, Onset®, Bourne, MA, EUA) posicionados no centro geométrico de cada baía, com registros automáticos a cada 10 min.

Os dados de temperatura do ar, umidade relativa foram avaliados por turno em cada semana experimental: manhã, tarde e noite. A média do período da manhã considerou as medições registradas entre 06:00 e 11:50 h, a tarde incluiu os registros de 12:00 a 17:50 h, e a

noite compreendeu o intervalo de 18:00 a 05:50 h. As avaliações realizadas nesses horários ao longo de sete dias foram utilizadas para calcular a média do turno em cada semana do experimento.

3.4.2 Avaliação da temperatura do microclima entre a bolsa de insulação e a pele escrotal

Durante a Fase II, cada bolsa de insulação foi equipada com um registrador de temperatura do tipo iButton® DS1922L (Maxim Integrated Products Inc., USA), posicionado entre a pele escrotal e a face externa da camada interna da bolsa. O dispositivo, com resolução de $\pm 0,0625$ °C e faixa de medição entre 10 e 45 °C, foi utilizado para monitorar a temperatura do microclima formado entre a bolsa de insulação e a superfície escrotal, com intervalos de registro programados a cada 30 minutos. A configuração, aquisição e exportação dos dados foram realizadas por meio do software OneWireViewer® (Maxim Integrated Products Inc., USA).



3.4.3 Coleta de dados termofisiológicos

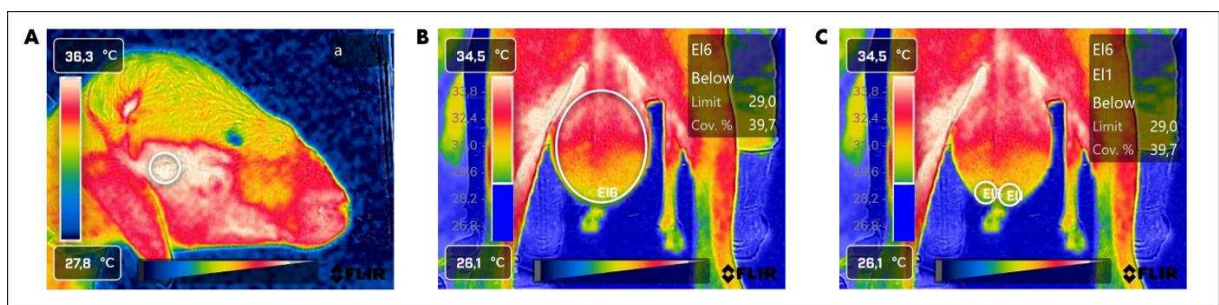
As variáveis termofisiológicas avaliadas incluíram temperatura retal, temperaturas escrotais e temperatura do globo ocular foram, as quais foram monitoradas quinzenalmente durante as Fases I e III e avaliadas em dois momentos na Fase II, sempre em três horários fixos (08:00, 12:00 e 16:00 h). Na Fase II, as avaliações foram realizadas após 24 h (D2) e 96 h (D4) do início da insulação; a obtenção das imagens termográficas demandou a remoção temporária da bolsa de insulação. No primeiro dia da Fase III, imediatamente após a remoção da bolsa de insulação, três avaliações sucessivas dessas temperaturas (retal, escrotal e ocular) foram realizadas com intervalos de 30 min (0, 30 e 60 min), para monitorar a recuperação da termorregulação escrotal.

A temperatura retal dos carneiros foi obtida usando um termômetro clínico digital (Incoterm®, Brasil), inserido no reto por aproximadamente 15 s. As temperaturas da pele

escrotal e ocular foram medidas usando uma câmera termográfica infravermelha (FLIR® E5 Pro, USA), com emissividade ajustada para 0,98, conforme recomendado para tecidos biológicos (SOERENSEN et al., 2014). Todas as imagens foram obtidas em baias cobertas, evitando a incidência direta de luz solar, e a distância entre o operador e cada carneiro foi padronizada em 0,6 m, conforme adaptação de estudos prévios (SANTANA et al., 2025). As imagens obtidas pela câmera foram analisadas usando o software FLIR Thermal Studio® (Teledyne FLIR, USA). Para garantir a precisão da medição, os termogramas foram corrigidos usando os dados de temperatura do ar e umidade relativa registrados no momento e local da coleta (SANTANA et al., 2025). As imagens foram processadas no modo de fusão MSX, usando a paleta de cores *Rainbow*, com distribuição linear de temperatura e controle de isoterma ajustado para a opção *Dew point*. Cada termograma foi analisado em triplicata.

A avaliação da temperatura do globo ocular foi feita com uma elipse de 30×30 pixels (Figura 2A), conforme adaptado de Silva et al. (2023a). A mensuração da temperatura da superfície escrotal foi realizada por meio de uma elipse padronizada de 105×85 pixels (Figura 2B). A temperatura superficial da cauda do epidídimo foi mensurada a partir da média dos valores obtidos em duas elipses padronizadas, cada uma com dimensões de 22×22 pixels (Figura 2C).

Figura 2 — Imagens termográficas de carneiros deslanados obtidas com câmera térmica infravermelha (FLIR® E5 Pro, USA). (A) Matriz utilizada para avaliação da temperatura do globo ocular (TOG), composta por uma área padronizada de 30×30 pixels. (B) Delineamento da área elíptica usada para avaliação da temperatura da superfície escrotal (TSST) (105×85 pixels). (C) Delineamento de duas áreas elípticas padronizadas utilizadas para avaliação da temperatura da cauda do epidídimo (STEP), cada uma medindo 22×22 pixels.



Os dados de temperatura retal, do globo ocular, da superfície escrotal e da cauda do epidídimo foram expressos como médias diárias, calculadas a partir das medições realizadas às 08:00, 12:00 e 16:00 h em cada semana experimental. Com base nessas médias diárias, foram determinados os gradientes térmicos entre: globo ocular e superfície escrotal (TOG–TSST),

globo ocular e cauda do epidídimo (TOG–STEP), temperatura retal e superfície escrotal (RT–TSST) e temperatura retal e cauda do epidídimo (RT–STEP).

3.5 Parâmetros reprodutivos e qualidade

3.5.1 Coleta de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas de forma padronizada no período das 09:00 às 09:30 h da manhã, utilizando uma fêmea condicionada como manequim e uma vagina artificial (IMV Technologies, França), pré-aquecida a aproximadamente 39 °C, à qual foram acoplados um cone não tóxico e um tubo falcon de 15 mL para coleta do ejaculado. Na Fase I, foram realizadas quatro coletas para obtenção dos dados basais (controle), enquanto na Fase III ocorreram nove coletas até a recuperação das características espermáticas. Na semana 1 (Fase III), a coleta foi realizada em até 2 horas após a remoção da bolsa de insulação para identificar alterações imediatas na qualidade espermática (ROCHA et al., 2015; ALVES et al., 2016; VIANA NETO et al., 2024). A circunferência escrotal foi medida com uma fita métrica flexível, semanalmente durante as Fases I e III do experimento, conforme Rocha et al. (2015).

3.5.2 Cinética espermática

O ejaculado fresco foi diluído na proporção de 1:100 no diluidor comercial Optidux® (Reprodux, São Paulo, Brasil), previamente aquecido a 37 °C, e avaliado por meio de sistema de análise computadorizada de sêmen (CASA; AndroScope®, Minitube GmbH, Tiefenbach, Alemanha; versão 1.1.0.9). A análise foi realizada em lâminas pré-aquecidas a 37 °C, mantidas em chapa aquecedora, utilizando câmara com altura de 20 µm. As configurações de câmera e calibração adotadas no sistema incluíram limiar de detecção ajustado para 17, resolução espacial de 0,55 µm/pixel e critérios de identificação espermática baseados em área mínima e máxima de 10 e 80 µm², respectivamente. Para a calibração do deslocamento celular, foram utilizados valores de 1184 no eixo X e 592 no eixo Y. A avaliação foi conduzida a partir da média de três campos amostrais selecionados aleatoriamente por lâmina. Foram avaliados os seguintes parâmetros cinéticos e de motilidade espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), motilidade local (MLOC), motilidade lenta (ML), motilidade rápida (MR), motilidade circular (MC), espermatozoides imóveis (IS), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média de percurso (VAP), distância curvilínea percorrida (DCL), distância em linha reta (DSL) e distância média de percurso (DAP), conforme metodologia descrita por Rego et al. (2016).

3.5.3 Concentração espermática

Uma alíquota de sêmen fresco foi diluída na proporção de 1:40 (v/v) em solução salina tamponada contendo formaldeído para fixação, e a concentração espermática foi estimada medindo a transmitância em um espectrofotômetro (IL-226-NM, Kasuaki, China) ajustado para 540 nm, conforme metodologia adaptada de Salmito-Vanderley et al. (2023).

3.5.4 Viabilidade e morfologia espermática

A viabilidade espermática foi avaliada por meio da coloração eosina-nigrosina. Para isso, 1 µL de sêmen fresco foi depositado em uma lâmina de vidro pré-aquecida a 37 °C e homogeneizado com 4 µL do corante, seguido pela preparação de um esfregaço, conforme adaptações de Handarini et al. (2024). Em cada lâmina, 200 espermatozoides foram avaliados sob microscopia ótica em aumento de 400× (Eclipse Si, Nikon, Tokyo, Japan) e classificados quanto à vitalidade; células não coradas foram consideradas viáveis, e aquelas coradas em rosa-avermelhado foram consideradas não viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem.

A morfologia espermática foi avaliada por meio de esfregaços em lâminas de vidro coradas com Rosa Bengala, usando 1 µL de sêmen fresco e 4 µL do corante, adaptado de Sousa et al. (2013). A morfologia espermática foi analisada sob aumento de 1000×, utilizando objetiva de imersão em óleo em microscópio óptico (Eclipse Si, Nikon, Tokyo, Japan), avaliando-se um total de 200 células. As células foram classificadas quanto a defeitos maiores, menores e totais, conforme os critérios descritos por Blom (1973).

3.5.5 Integridade do DNA espermático

A avaliação da integridade do DNA espermático foi realizada usando o teste de dispersão da cromatina espermática (SCD), conforme detalhado por Viana Neto et al. (2024). Para o ensaio, uma alíquota de 2 µL de sêmen de cada animal foi diluída em 1,5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). A partir desta solução, 25 µL foram combinados com 50 µL de agarose de baixo ponto de fusão. Alíquotas de 2 µL dessa mistura foram colocadas em lâminas previamente revestidas com Agarose NA 0,65%. As lâminas foram resfriadas a 4 °C por 5 min e posteriormente incubadas em HCl 0,08 N por 12 min na ausência de luz. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas em solução de lise (2 M NaCl, 0,5% SDS, 0,1% Triton-X, 0,02 M EDTA, 2 M β-mercaptoetanol e 0,2 M Tris-HCl) por 30 min. Em seguida, foram submersas em água destilada por 5 min e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 99,5%) por 2 min cada. Finalmente, as lâminas foram secas ao ar à temperatura ambiente e coradas usando os reagentes do kit comercial Panótico Rápido (Laborclin, Paraná,

Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Após o preparo, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz sob aumento de 400× (Eclipse Si, Nikon, Tokyo, Japan). Um total de 200 espermatozoides foram classificados em duas categorias: células com halo (DNA intacto) e células sem halo (DNA fragmentado).

3.5.6 Dinâmica da ligação das Ram Seminal Vesicle Proteins (RSVPs)

A dinâmica de ligação das RSVPs aos espermatozoides foi avaliada por imunocitoquímica em quatro momentos-chave: durante a fase controle (semana -1, relativa ao início da insulação), imediatamente após a remoção das bolsas de insulação (semana 1), após a detecção de diminuição significativa da motilidade total (semana 4) e durante a recuperação das características espermáticas (semana 7). A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rodríguez-Villamil et al. (2016) e Viana Neto et al. (2024), com adaptações. Resumidamente, após a coleta de sêmen, uma alíquota foi centrifugada a $700 \times g$ por 15 min à temperatura ambiente para separar as células espermáticas do plasma seminal. Em seguida, uma amostra contendo 1×10^7 espermatozoides foi lavada duas vezes em PBS e fixada com paraformaldeído a 2% (PFA) por 10 min a 4 °C em lâminas Superfrost Plus (Knittel Glass, Bielefeld, NW, Alemanha). Após a fixação, as células foram lavadas com PBS contendo 0,3% Tween-20 (PBS-T) e incubadas por 1 h a 4 °C em uma solução bloqueadora consistindo de 5% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS-T. As lâminas foram então incubadas por 1 h a 4 °C com um anticorpo primário policlonal anti-RSVP produzido em coelho (fornecido pelo Dr. Puttaswamy Manjunath, Department of Medicine, University of Montreal, Canadá), diluído 1:500 em PBS-T contendo 2% de BSA. Após essa etapa, as células espermáticas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas no escuro por 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína; 1:300, Santa Cruz, EUA), diluído em PBS-T. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente (3× com PBS-T) e incubadas por 10 min à temperatura ambiente com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 2,5 mg/mL; Life Technologies, EUA), seguido por uma lavagem final em PBS por 1 min. As amostras foram montadas com lamínulas usando meio de montagem antifade (ProLong™ Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, EUA) e analisadas em um microscópio de fluorescência ZEISS Apotome 3 (Carl Zeiss, Alemanha) com objetiva de 40× (aumento total 400×). As imagens foram capturadas e processadas usando o software ZEN 2011 (Zeiss, Alemanha).

A análise quantitativa da intensidade de fluorescência do FITC foi realizada usando o software Fiji/ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>). Núcleos corados com DAPI foram

usados para identificar espermatozoides individuais, garantindo uma segmentação celular precisa. Para cada animal, 200 espermatozoides foram analisados em cada ponto experimental (semanas -1, 1, 4 e 7) usando parâmetros pré-definidos para tamanho (9–60 pixels) e circularidade (0,20–1,00), previamente calibrados para garantir consistência. Regiões de interesse (ROIs) correspondentes a cada núcleo foram geradas, e a fluorescência FITC associada foi medida dentro dessas ROIs. A intensidade média de fluorescência e os valores de densidade integrada foram registrados para cada ponto de tempo e subsequentemente submetidos à análise estatística para avaliar as alterações temporais na ligação da RSVP ao longo do experimento.

3.6 Análise estatística

As variáveis seminais foram analisadas para avaliar o efeito do período experimental utilizando uma abordagem não paramétrica baseada no teste de Friedman (Ipe, 1987). Inicialmente, as variáveis foram transformadas em postos (ranks), após o que um modelo linear de efeitos mistos foi ajustado, considerando o período como efeito fixo e o animal como efeito aleatório. Comparações post hoc entre os grupos foram realizadas por meio do teste de Tukey.

A variabilidade individual na resposta reprodutiva ao estresse térmico foi avaliada por meio de análise de componentes principais (PCA), utilizando variáveis reprodutivas normalizadas da quarta semana após a insulação escrotal. Após a obtenção dos escores da PCA, o método de agrupamento k-means foi aplicado para classificar os animais em dois grupos, denominados alta e baixa termotolerância, de acordo com o nível médio de suas variáveis reprodutivas. As diferenças entre os grupos de alta e baixa termotolerância foram avaliadas utilizando o teste de Kruskal–Wallis.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, Viena, Áustria), com os pacotes *lme4* (BATES et al., 2015), *emmeans* (LENTH, 2023) e *multcomp* (HOTHORN, 2020). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis ambientais

Neste estudo, as maiores médias de temperatura do ar foram registradas no período da tarde ao longo de todo o experimento. O maior valor semanal ocorreu à tarde da semana -2 (35,1 °C; pré-insulação), enquanto a menor média foi observada no período da manhã da semana de insulação escrotal (25,8 °C; semana 0). As demais médias semanais encontram-se descritas na Tabela 1.

Quanto à umidade relativa do ar, o período noturno apresentou consistentemente as maiores médias durante todas as semanas experimentais. O valor máximo foi registrado na noite da semana de insulação escrotal (84,1%; semana 0), ao passo que o menor valor ocorreu no período da tarde da quinta semana pós-insulação (45,0%; Tabela 1).

Tabela 1 — Variáveis ambientais registradas durante o período experimental, incluindo temperatura do ar (°C) e umidade relativa (%), avaliadas conforme o período do dia (manhã, tarde e noite). Os valores representam médias semanais. As semanas -4 a -2 correspondem à Fase I (controle), a insulação escrotal de sete dias à Fase II (semana 0), e as semanas 1 a 9 à Fase III.

Period of the day	Variables	Weeks								
		-4	-2	0	1	3	5	7	9	
Morning	Air temperature (°C)	28,1	30,5	28,9	31,1	30,0	30,9	30,6	31,4	
	Relative humidity (%)	71,0	61,3	74,8	59,0	68,6	51,9	58,3	53,8	
Afternoon	Air temperature (°C)	32,7	35,1	33,2	34,9	34,0	35,0	34,3	34,7	
	Relative humidity (%)	59,0	49,0	55,7	49,2	53,4	45,0	47,7	47,5	
Night	Air temperature (°C)	26,1	26,4	25,8	26,2	26,3	26,0	26,1	26,5	
	Relative humidity (%)	83,5	82,9	84,1	82,3	81,2	78,3	78,4	77,5	

Os valores representam médias semanais obtidas a partir de medições realizadas nos períodos da manhã, tarde e noite.

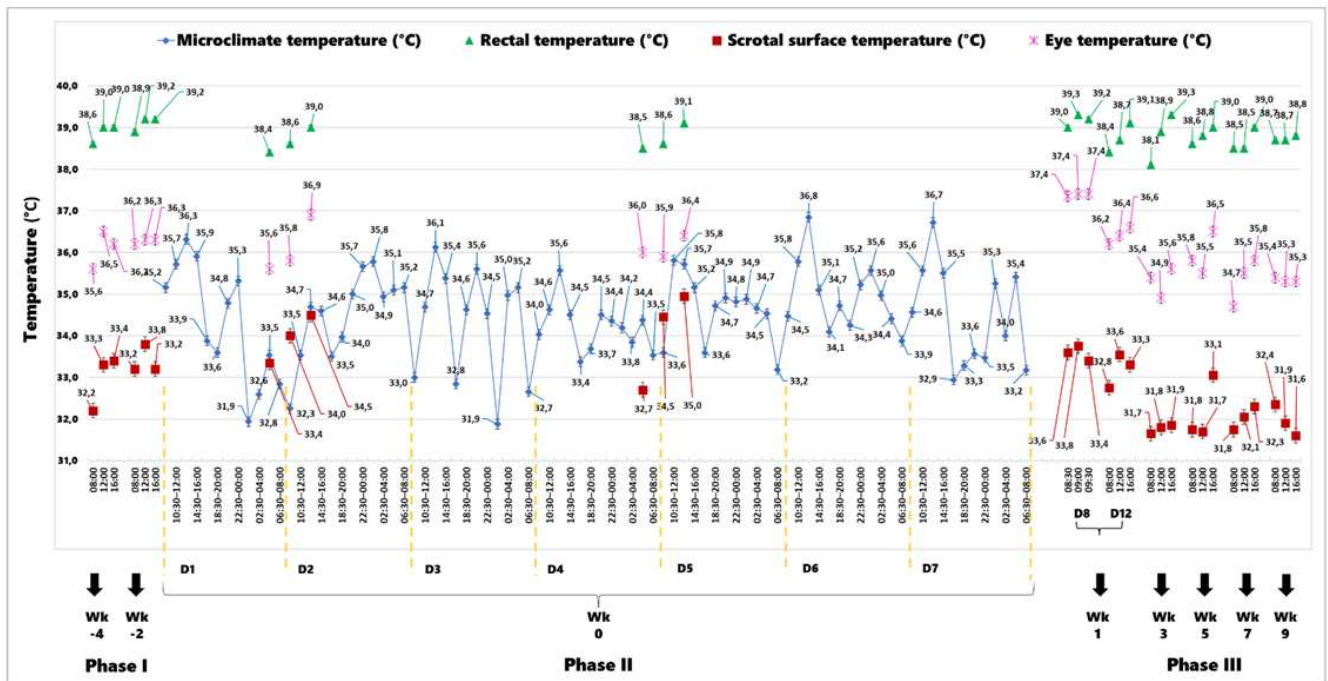
4.2 Temperaturas corporais e do microambiente escrotal sob o dispositivo de insulação

Na Figura 3 apresenta-se o panorama geral das avaliações térmicas realizadas ao longo do período experimental, incluindo as médias registradas em diferentes horários do dia (08:00, 12:00 e 16:00 h) para a temperatura retal, do globo ocular e da superfície escrotal. Cada ponto representa a média de quatro avaliações consecutivas realizadas a cada 30 min, correspondendo a um intervalo total de duas horas, com os respectivos valores indicados. Observou-se que a temperatura do microclima acompanhou o padrão de variação térmica diária, elevando-se conforme o aumento da temperatura ambiente e apresentando médias mais altas no

período da tarde (12:00–17:50 h). Mesmo com essa variação, o microclima manteve-se relativamente estável e com valores consistentemente elevados. No período noturno, as médias foram inferiores às observadas à tarde. Após pequenas reduções no início da noite, a temperatura voltou a se elevar a partir das 18:30 h, atingindo picos após as 22:00 h, com médias de até 35,8 °C.

Imediatamente após a insulação escrotal, foram registrados valores de temperatura escrotal de 33,6 °C (08:30 h), 33,8 °C (09:00 h) e 33,4 °C (09:30 h), correspondendo às maiores médias observadas durante o período de efeito imediato da insulação (Figura 3).

Figura 3 — Visão geral da variação da temperatura do microclima (°C; losangos azuis), da temperatura retal (°C; triângulos verdes), da temperatura da superfície escrotal (°C; quadrados vermelhos) e da temperatura do globo ocular (°C; asteriscos rosas) de carneiros deslançados submetidos à insulação escrotal ao longo do período experimental. As semanas -4 e -2 correspondem ao período pré-insulação (Fase I – controle); a insulação escrotal foi mantida por sete dias (semana 0; Fase II), com avaliações nos dias 2 (D2) e 4 (D4). No dia 8 (D8), as avaliações foram realizadas às 08:30, 09:00 e 09:30 h, imediatamente após a remoção da bolsa de insulação, para monitorar a recuperação da termorregulação escrotal. As semanas 1 a 9 correspondem ao período pós-insulação (Fase III). A temperatura do microclima foi monitorada continuamente apenas durante a insulação, enquanto as demais temperaturas foram avaliadas em horários fixos (08:00, 12:00 e 16:00 h). Os dados são apresentados de forma descritiva, sem análise estatística.



Os animais apresentaram temperaturas médias do microclima entre a bolsa de insulação e a pele do escroto relativamente estáveis, com baixa variação entre indivíduos (34,1–35,6 °C; amplitude aproximada de 1,5 °C). As médias da temperatura do microclima foram

Weeks	Temperatures (°C)				Thermal gradients (°C)			
-4	39,0	36,20	33,30	31,60	2,90	5,70	4,60	7,40
-2	39,2	36,30	33,20	31,90	3,10	6,00	4,40	7,30
D2	38,6	35,80	33,95	32,87	1,85	4,65	2,93	5,73
D4	38,7	36,10	34,03	32,42	2,07	4,67	3,68	6,28
1	38,7	36,40	33,30	30,95	3,10	5,40	5,45	7,75
3	38,9	35,40	31,80	29,93	3,60	7,10	5,47	8,97
5	38,8	35,80	31,75	30,33	4,05	7,05	5,47	8,47
7	38,5	35,50	32,05	30,42	3,45	6,45	5,08	8,08
9	38,7	35,30	31,90	30,68	3,40	6,80	4,62	8,02

RT = temperatura retal; TOG = temperatura do globo ocular; TSST = temperatura da superfície escrotal; STEP = temperatura da cauda do epidídimo. Os valores representam médias diárias calculadas a partir de três medições por dia (08:00, 12:00 e 16:00).

A temperatura do globo ocular apresentou baixa variação ao longo do experimento, variando de 35,30 °C (semana 9 pós-insulação) a 36,4 °C (semana 1 pós-insulação). Considerando a média da pré-insulação (36,25 °C), houve diminuição durante a fase de insulação, com médias de 35,8 °C no D2 (-0,45 °C) e 36,1 °C no D4 (-0,15 °C; Figura 5B).

A temperatura média da superfície escrotal aumentou durante a insulação, passando de 33,25 °C na pré-insulação para 33,95 °C no D2 e 34,05 °C no D4. Na semana 1 pós-insulação, reduziu para 33,30 °C, valor próximo ao período de referência (pré-insulação). Da terceira à nona semana pós-insulação, permaneceu consistentemente inferior às médias observadas nos dias de insulação (Figura 5C). Os termogramas indicaram maior homogeneidade térmica da superfície escrotal na fase de insulação (D2 e D4), em contraste com o período pré-insulação, quando havia variação de intensidade de cor entre as regiões proximal, medial e distal do escroto (Figura 6A–D).

A temperatura superficial da cauda do epidídimo também foi elevada com a insulação escrotal, atingindo 32,87 °C no D2 e 32,42 °C no D4, o que representa aumentos de 1,12 e 0,67 °C em relação à média pré-insulação (31,75 °C). Nas semanas 1–9 pós-insulação, os valores médios permaneceram abaixo de 31,00 °C, aproximando-se novamente do nível basal (pré-insulação; Figura 5D).

Figura 5 — Variação temporal das temperaturas corporais em carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal (N = 7): (A) temperatura retal (RT), (B) temperatura do globo ocular (TOG), (C) temperatura da superfície escrotal (TSST) e (D) temperatura da cauda do epidídimo (STEP). Cada ponto representa a média diária da respectiva temperatura, calculada a partir dos valores obtidos em três horários no mesmo dia (08:00, 12:00 e 16:00)

h). As semanas -4 a -2 correspondem ao período pré-insulação (Fase I – controle); a insulação escrotal foi mantida por sete dias (Fase II), com avaliações nos dias 2 (D2) e 4 (D4); e as semanas 1 a 9 correspondem ao período pós-insulação (Fase III).

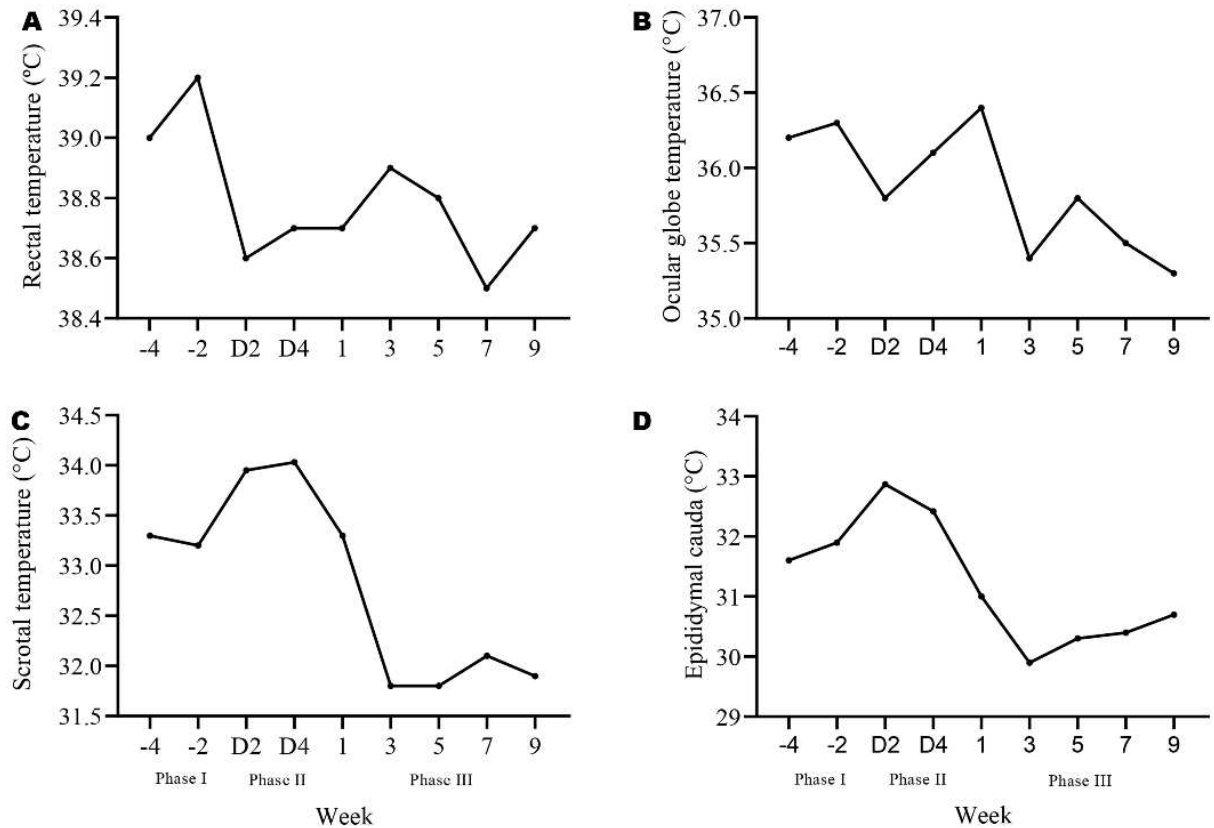
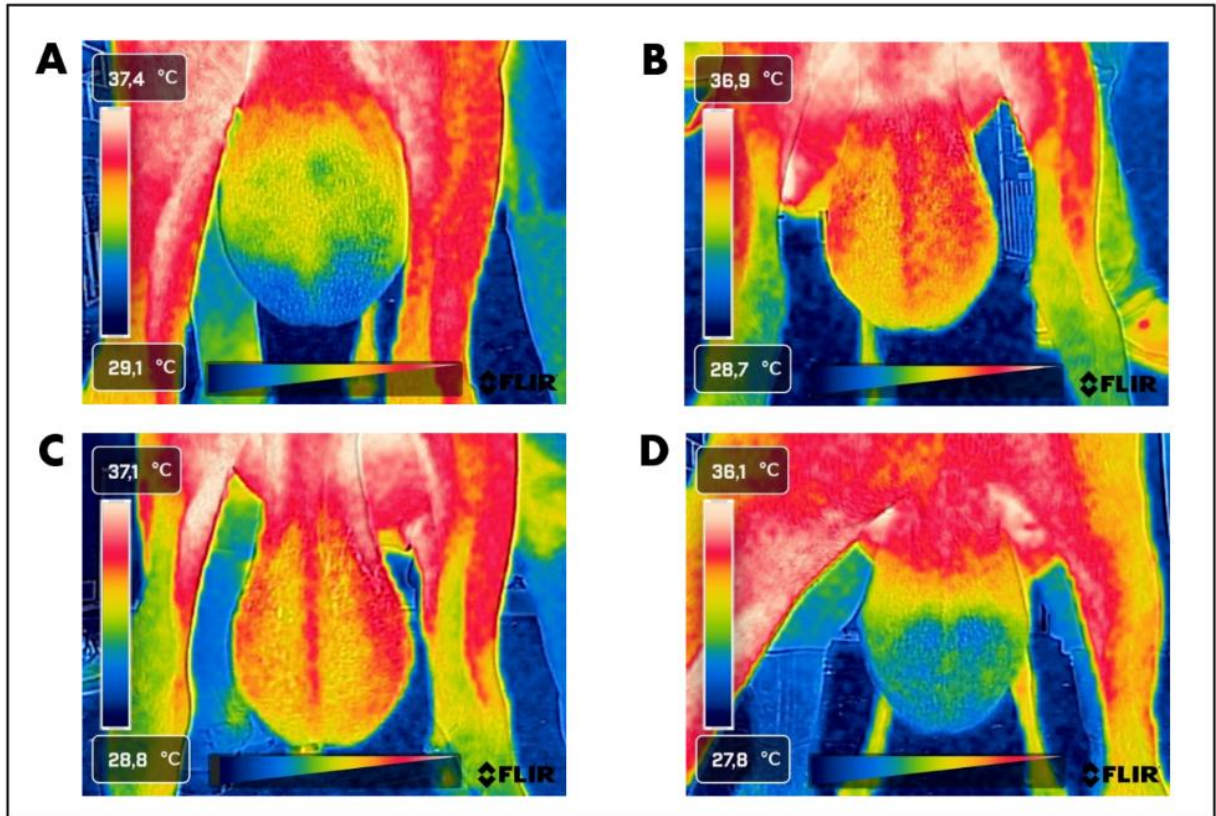


Figura 6 — Imagens termográficas ilustrando a distribuição da temperatura da superfície escrotal em carneiros deslançados submetidos a estresse térmico moderado induzido por insulação escrotal (N = 7). As imagens correspondem a: (A) período pré-insulação (Fase I); (B) dia 2 de insulação escrotal (D2; Fase II); (C) dia 4 de insulação escrotal (D4; Fase II); e (D) uma semana após a remoção da bolsa insuladora, correspondente ao período pós-insulação (Fase III). Todas as imagens foram corrigidas pela temperatura do ar ambiente e pela umidade relativa medidas no local experimental.



4.4 Gradientes térmicos

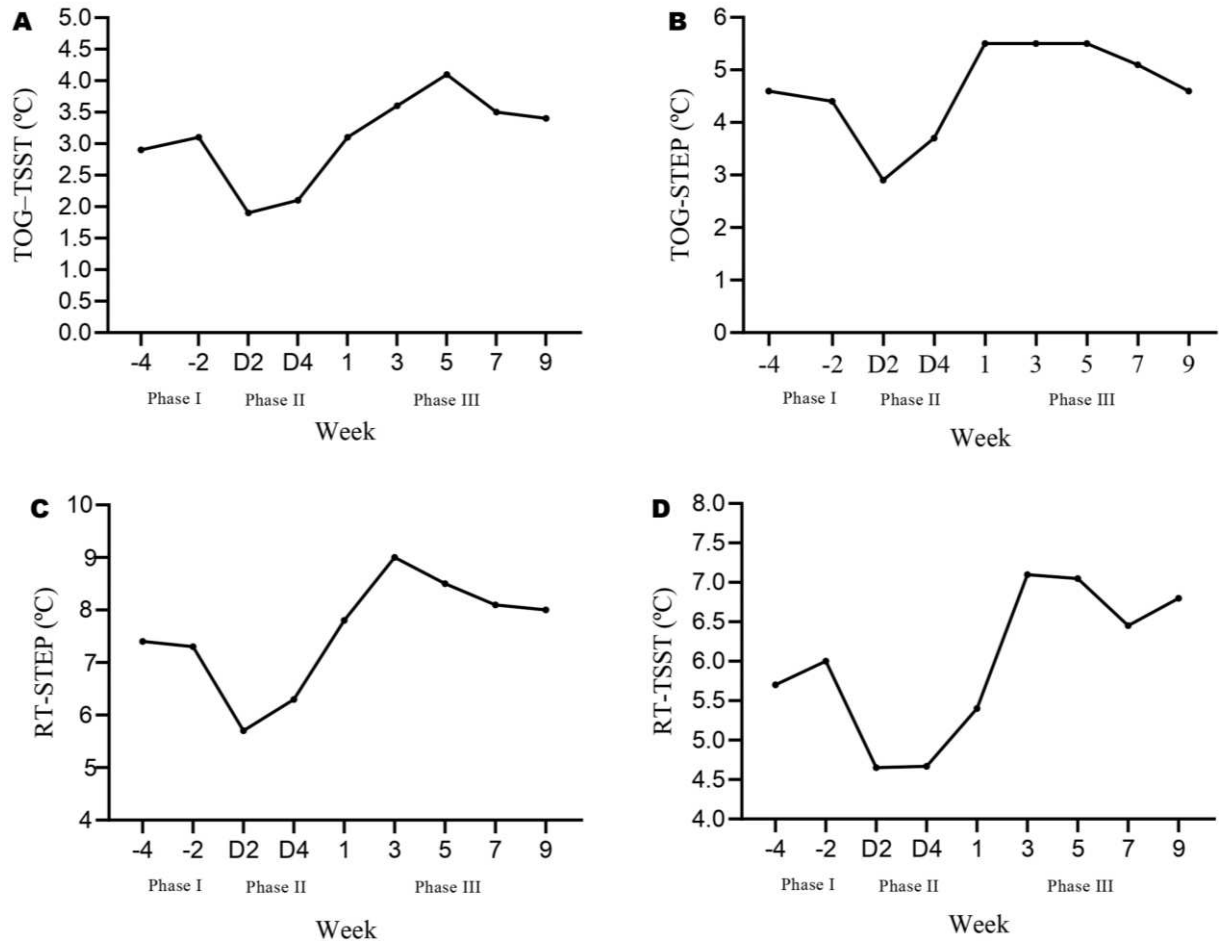
Na fase de pré-insulação, o gradiente térmico entre a temperatura do globo ocular e a superfície escrotal foi de 3,00 °C. Com a insulação escrotal, houve redução para 1,85 °C no dia 2 (D2) e 2,07 °C no dia 4 (D4). Já na semana 1 pós-insulação, o valor médio retornou para 3,10 °C, próximo ao observado antes do tratamento (Figura 7A).

Para o gradiente entre a temperatura do globo ocular e a cauda do epidídimo, a média pré-insulação foi de 4,50 °C, com queda para 2,93 °C (D2) e 3,68 °C (D4), seguida de recuperação nas semanas pós-insulação, atingindo 5,50 °C, valor semelhante ao da fase prévia (Figura 7B).

De forma semelhante, o gradiente entre a temperatura retal e a superfície escrotal apresentou média de 5,85 °C na pré-insulação e diminuiu para 4,65 °C (D2) e 4,67 °C (D4), com restabelecimento para 5,40 °C na semana 1 pós-insulação (Figura 7C). Entre a temperatura retal e a cauda do epidídimo, o gradiente da pré-insulação foi reduzido de 7,35 °C para 5,73 °C no D2 e 6,28 °C no D4, correspondendo a reduções de 1,62 °C e 1,07 °C, respectivamente, e retornou a 7,75 °C após a remoção da insulação (pós-insulação; Figura 7D).

Figura 7 — Gradientes térmicos entre a temperatura do globo ocular (TOG), a temperatura da superfície escrotal (TSST), a temperatura retal (RT) e a temperatura da cauda do epidídimo (STEP) em ovinos deslanados submetidos

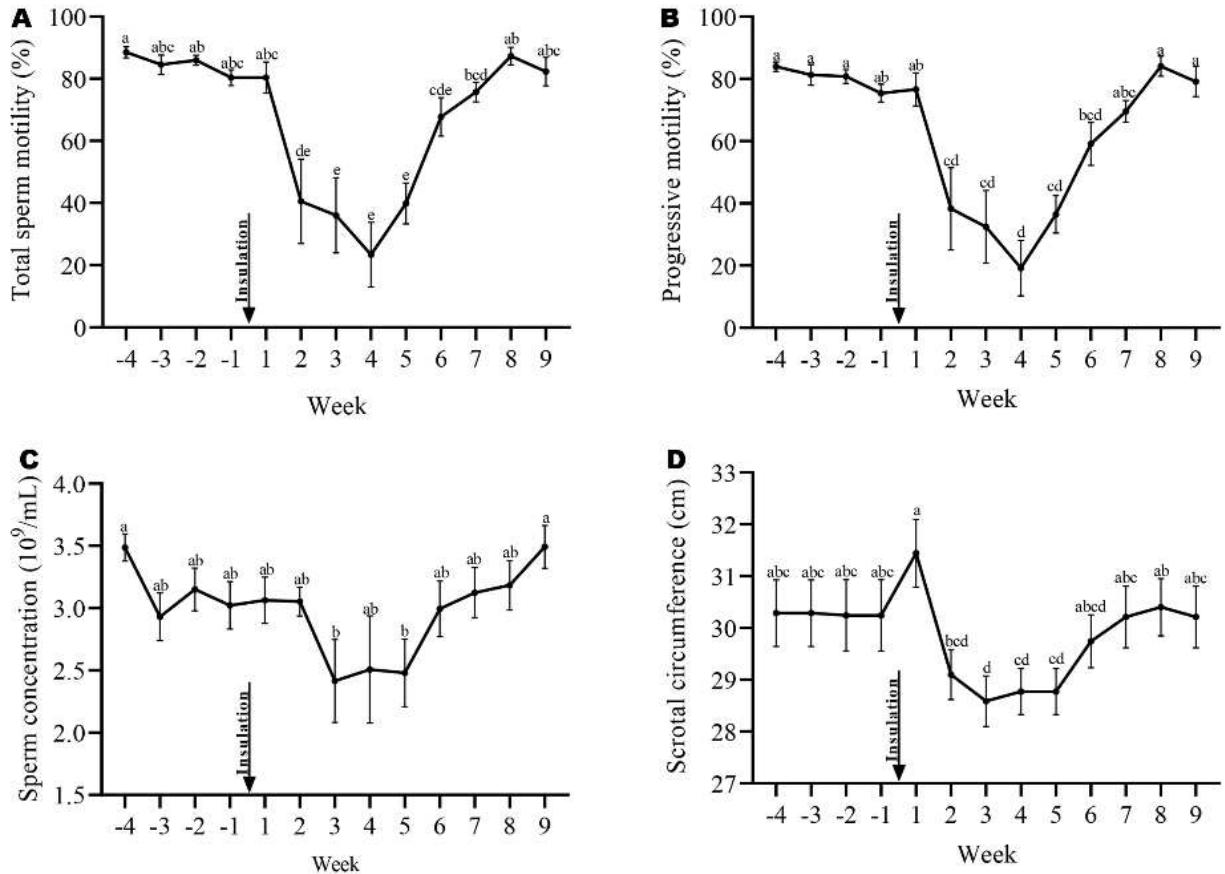
à insulação escrotal (N = 7): (A) TOG-TSST, (B) TOG-STEP, (C) RT-TSST e (D) RT-STEP. As diferenças entre as variáveis apresentadas nos eixos correspondem aos respectivos gradientes térmicos (°C). As semanas -4 a -2 correspondem ao período pré-insulação (Fase I – controle); a insulação escrotal foi mantida por sete dias (Fase II), com avaliações nos dias 2 (D2) e 4 (D4); e as semanas 1 a 9 correspondem ao período pós-insulação (Fase III).



4.5 Cinética espermática

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na fase pós-insulação (III), houve redução na motilidade total na semana 2 ($40,6 \pm 13,6\%$; $p < 0,05$), com mínimos na semana 4 ($23,4 \pm 10,4\%$; $p < 0,05$) em comparação à Fase I ($85,2 \pm 2,2\%$). O retorno aos níveis pré-insulação ocorreu na semana 6 ($67,7 \pm 6,2\%$; $p > 0,05$; Figura 8A). De forma semelhante, a motilidade espermática progressiva também sofreu redução na semana 2 ($38,3 \pm 13,2\%$) em relação à pré-insulação ($80,4 \pm 2,5\%$; $p < 0,05$), alcançando os menores valores na semana 4 ($19,2 \pm 8,9\%$). O retorno de MP aos valores de referência ocorreu na semana 6 ($59,1 \pm 6,9\%$; $p > 0,05$; Figura 8B).

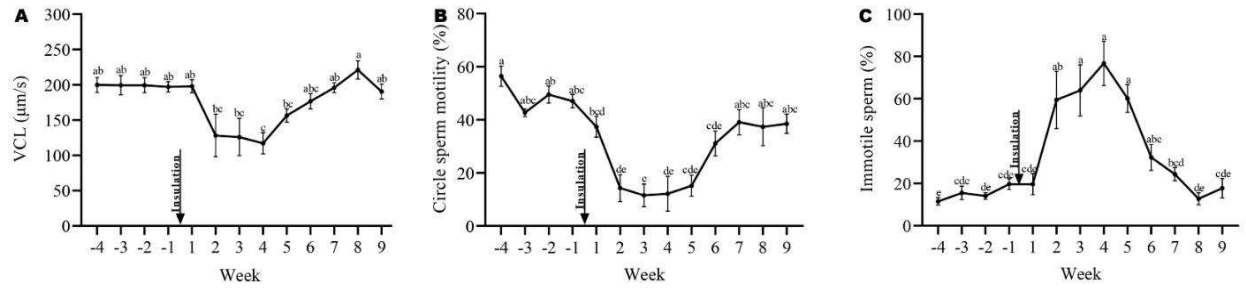
Figura 8 — Motilidade espermática total (A), motilidade progressiva (B), concentração espermática (C) e circunferência escrotal (D) de carneiros deslançados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



A VCL na pré-insulação foi de $199,0 \pm 10,6 \mu\text{m/s}$, reduzindo-se ($p < 0,05$) na semana 4 para $117,0 \pm 15,0 \mu\text{m/s}$ ($p < 0,05$), seu menor valor. A recuperação ocorreu na semana 5, quando a VCL não diferiu do período pré-insulação ($156,4 \pm 9,4 \mu\text{m/s}$; $p > 0,05$; Figura 9A). A porcentagem média de motilidade circular, que na fase pré-insulação era de $48,3 \pm 3,5\%$, apresentou redução na semana 2 pós-insulação ($14,3 \pm 5,1\%$; $p < 0,05$), atingindo seu menor valor na semana 3 ($11,6 \pm 4,3\%$). A partir da semana 6, os valores retornaram aos níveis de referência ($31,1 \pm 4,7\%$; $p > 0,05$; Figura 9B). A porcentagem média de espermatozoides imóveis aumentou de $14,8 \pm 2,2\%$ na pré-insulação para $59,4 \pm 13,6\%$ na semana 2 ($p < 0,05$), atingindo o maior valor na semana 4 ($76,8 \pm 10,5\%$). O retorno aos níveis de referência ocorreu na semana 6 ($p > 0,05$), quando $33,3 \pm 6,2\%$ das células permaneceram imóveis (Figura 9C).

Figura 9 — Velocidade curvilínea (VCL) (A), motilidade circular (B) e espermatozoides imóveis (C) de carneiros deslançados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas

–1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre as fases do estudo para os parâmetros VSL, VAP, DCL e DSL (Figura 10A–D), bem como para DAP, motilidade local, motilidade rápida e motilidade lenta (Figura 11A–D).

Figura 10 — Velocidade em linha reta (VSL) (A), velocidade média do trajeto (VAP) (B), distância curvilínea percorrida (DCL) (C) e distância em linha reta (DSL) (D) dos espermatozoides de carneiros deslançados submetidos à insulação escrotal. As semanas –4 a –1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas –1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

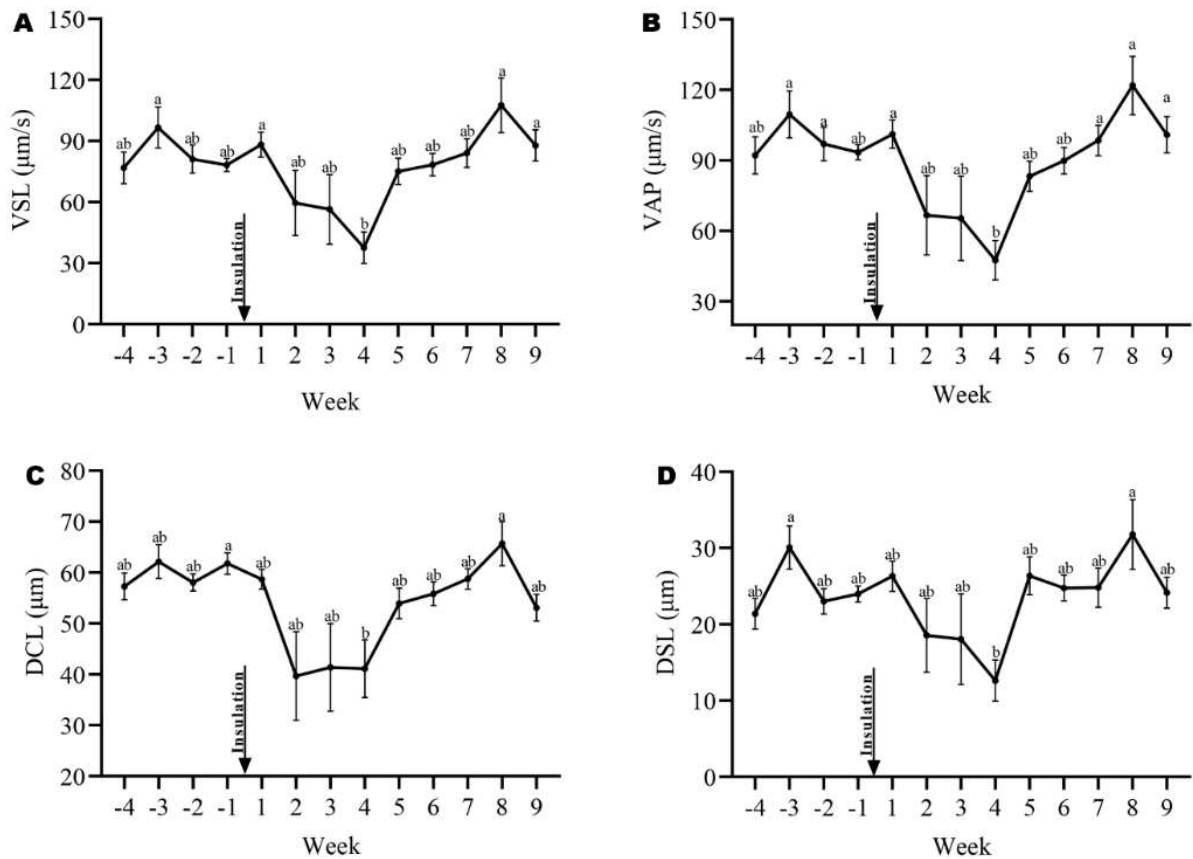
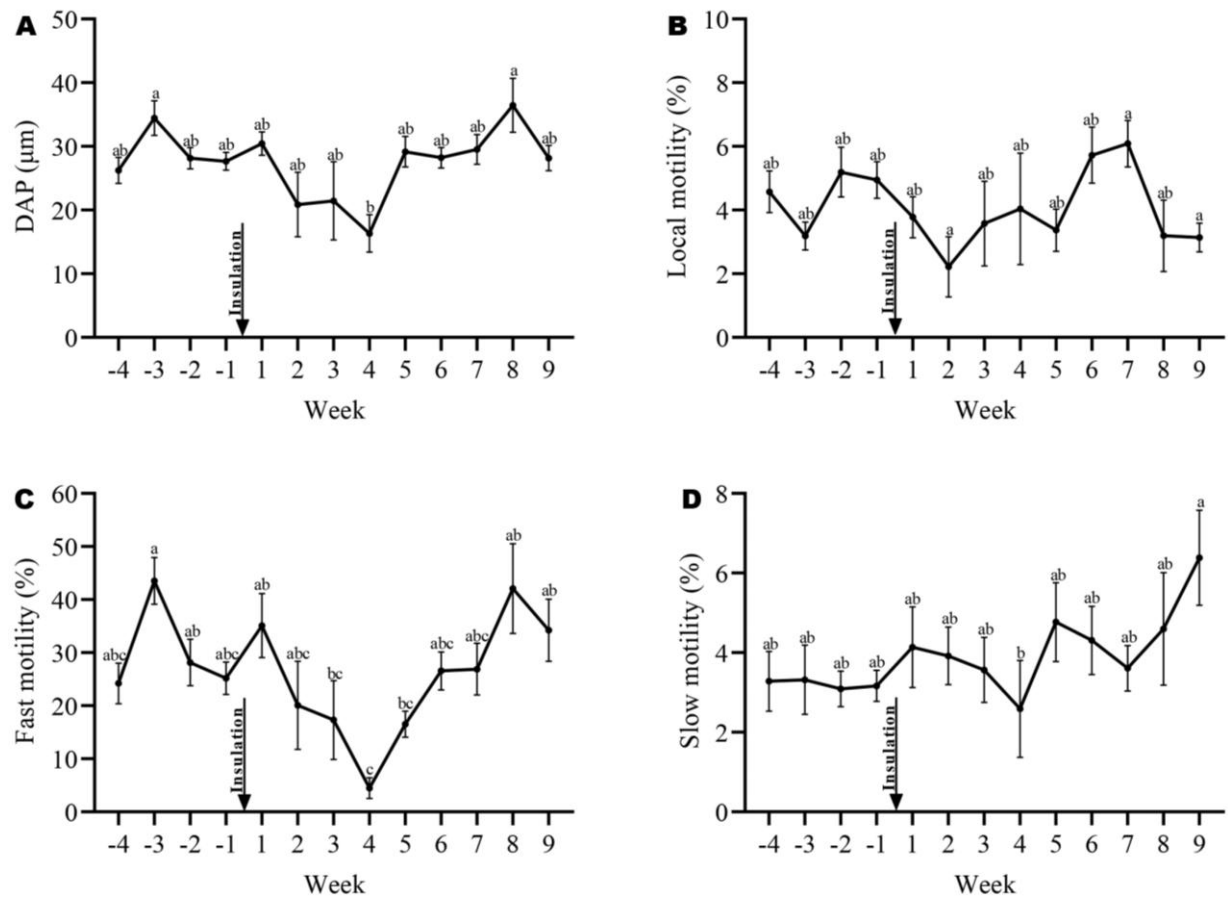


Figura 11 — Distância média do trajeto (DAP) (A), motilidade local (B), motilidade rápida (C) e motilidade lenta (D) dos espermatozoides de carneiros deslançados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



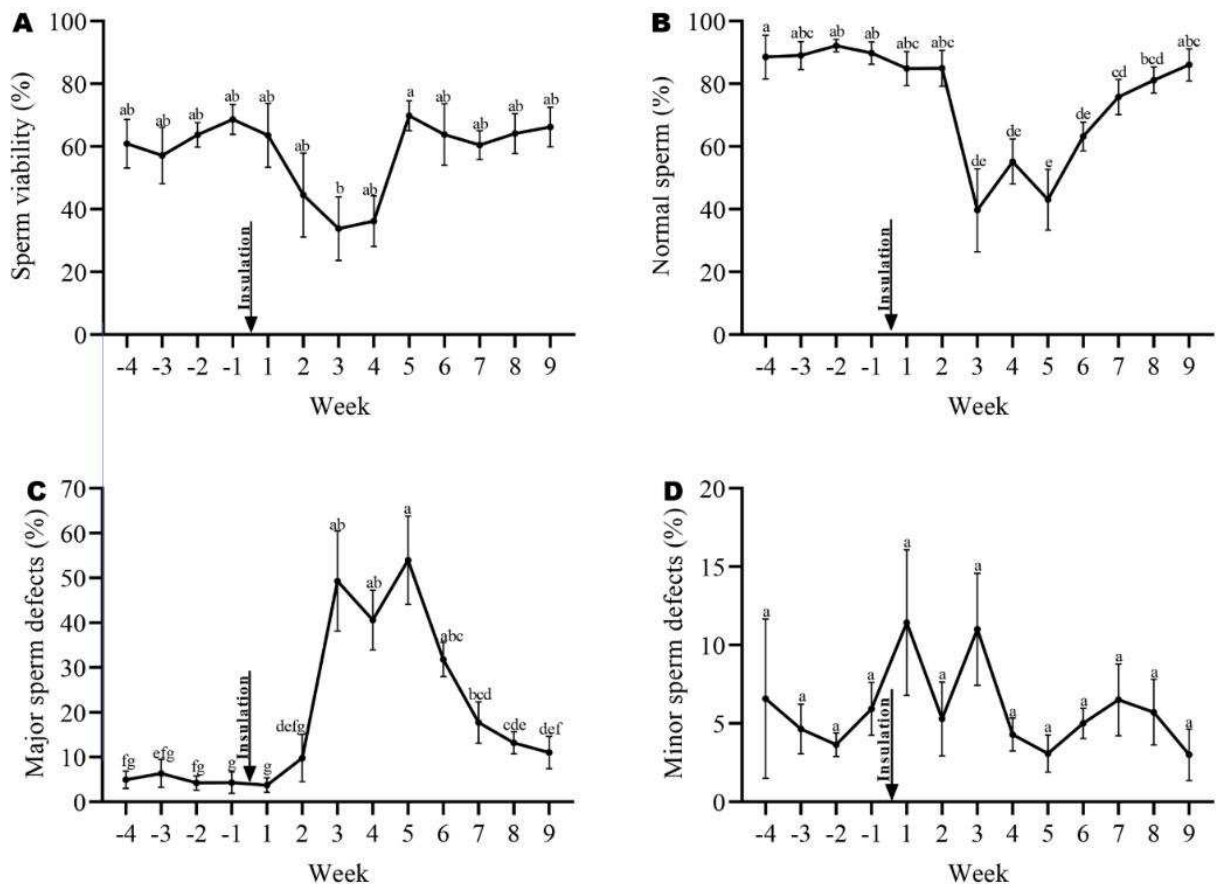
4.6 Concentração espermática e circunferência escrotal

Não houve diferença significativa na concentração espermática entre as fases do estudo ($p > 0,05$; Figura 8C). A maior média da circunferência escrotal foi observada na semana 1 ($31,4 \pm 0,6$ cm), imediatamente após a insulação escrotal, apresentando aumento de aproximadamente 1,2 cm em relação ao período pré-insulação ($30,3 \pm 0,7$ cm; $p > 0,05$). A circunferência escrotal reduziu ($p < 0,05$) na terceira semana pós-insulação, atingindo $28,6 \pm 0,5$ cm.

4.7 Morfologia e viabilidade espermática

A porcentagem média de espermatozoides normais na pré-insulação foi de $89,9 \pm 4,2\%$, atingindo o menor valor na semana 3 pós-insulação ($39,7 \pm 13,2\%$; $p < 0,05$) e retornando aos níveis de referência na semana 7 ($75,8 \pm 5,6\%$; $p > 0,05$; Figura 12B). A incidência de defeitos maiores aumentou significativamente a partir da semana 3 ($49,3 \pm 11,2\%$; $p < 0,05$) e atingiu seu pico na semana 5, representando incremento de 49% em relação ao período pré-insulação ($53,9 \pm 9,9\%$ vs. $4,9 \pm 2,3\%$; $p < 0,05$). Os valores voltaram a se igualar ao período pré-insulação na semana 8 ($13,1 \pm 2,5\%$; $p > 0,05$; Figura 12C). Não foram observadas diferenças significativas para viabilidade espermática e defeitos menores entre as fases do estudo ($p > 0,05$; Figura 12A e 12D).

Figura 12 — Viabilidade espermática (A), espermatozoides normais (B), defeitos maiores (C) e defeitos menores (D) de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

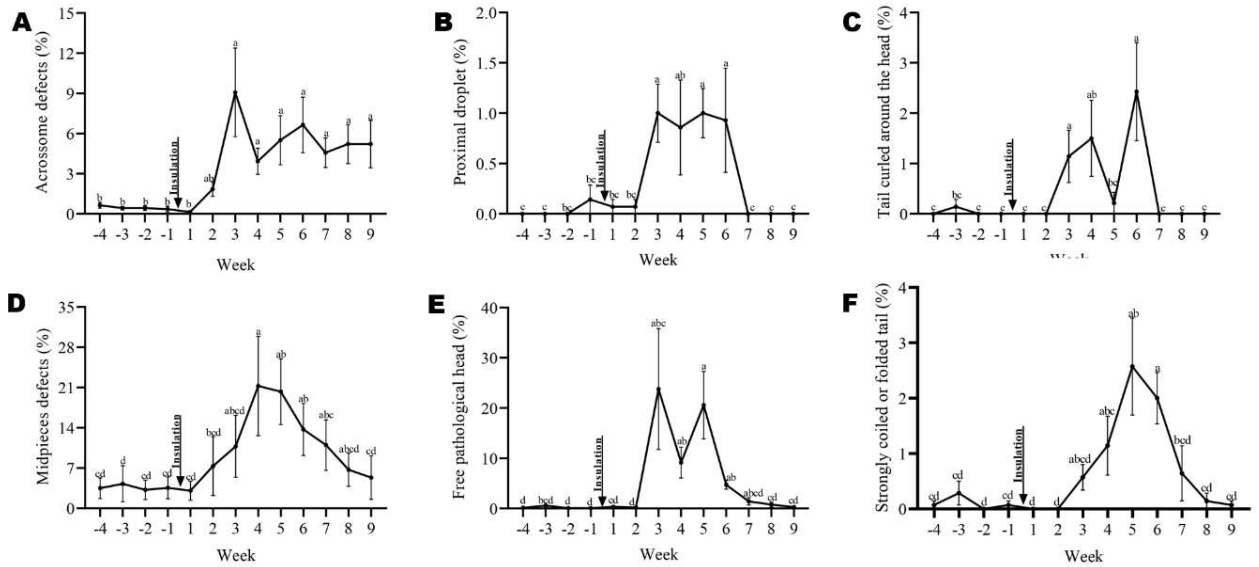


A avaliação dos defeitos morfológicos específicos evidenciou alterações temporais consistentes com o impacto do estresse térmico induzido por insulação escrotal (Figura 13A–

F). De modo geral, o aumento das anomalias espermáticas teve início na semana 3 do experimento, inicialmente envolvendo defeitos de acrossoma, gota citoplasmática proximal e cauda enrolada na cabeça, enquanto a cabeça isolada patológica, os defeitos da peça intermediária e a cauda fortemente enrolada apresentaram manifestação tardia, a partir das semanas subsequentes.

Especificamente, os defeitos de acrossoma apresentaram baixa ocorrência no período pré-insulação ($0,4 \pm 0,2\%$), com aumento expressivo na semana 3 pós-insulação ($9,1 \pm 3,3\%$; $p < 0,05$), mantendo-se elevado até a semana 9 ($5,2 \pm 1,8\%$) e ainda diferindo dos valores de referência ($p < 0,05$; Figura 13A). A ocorrência de gota citoplasmática proximal elevou-se precocemente na semana 3 ($1,0 \pm 0,3\%$; $p < 0,05$), permaneceu acima dos valores basais até a semana 6 ($0,9 \pm 0,5\%$) e retornou aos níveis de referência a partir da semana 7 ($0,0 \pm 0,0\%$; $p > 0,05$; Figura 13B). Os defeitos da peça intermediária aumentaram a partir da semana 4 ($21,3 \pm 8,6\%$; $p < 0,05$), mantendo-se elevados até a semana 6, sem diferença estatística em relação ao período pré-insulação a partir da semana 7 ($p > 0,05$; Figura 13D). Entre os defeitos de cauda, a cauda enrolada na cabeça apresentou aumento nas semanas 3 ($1,1 \pm 0,5\%$) e 6 ($2,4 \pm 1,0\%$; $p < 0,05$), com completa normalização observada a partir da semana 7 ($0,0 \pm 0,0\%$; Figura 13C), enquanto a cauda fortemente enrolada apresentou aumento significativo na semana 5 ($2,6 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$), com retorno aos níveis basais na semana 7 ($0,6 \pm 0,5\%$; $p > 0,05$; Figura 13F). Por fim, a incidência de cabeça isolada patológica aumentou significativamente apenas a partir da semana 5, atingindo pico de $20,6 \pm 6,7\%$ ($p < 0,05$) em comparação ao período pré-insulação ($0,1 \pm 0,1\%$), com posterior normalização observada na semana 7 ($1,4 \pm 0,7\%$; $p > 0,05$; Figura 13E).

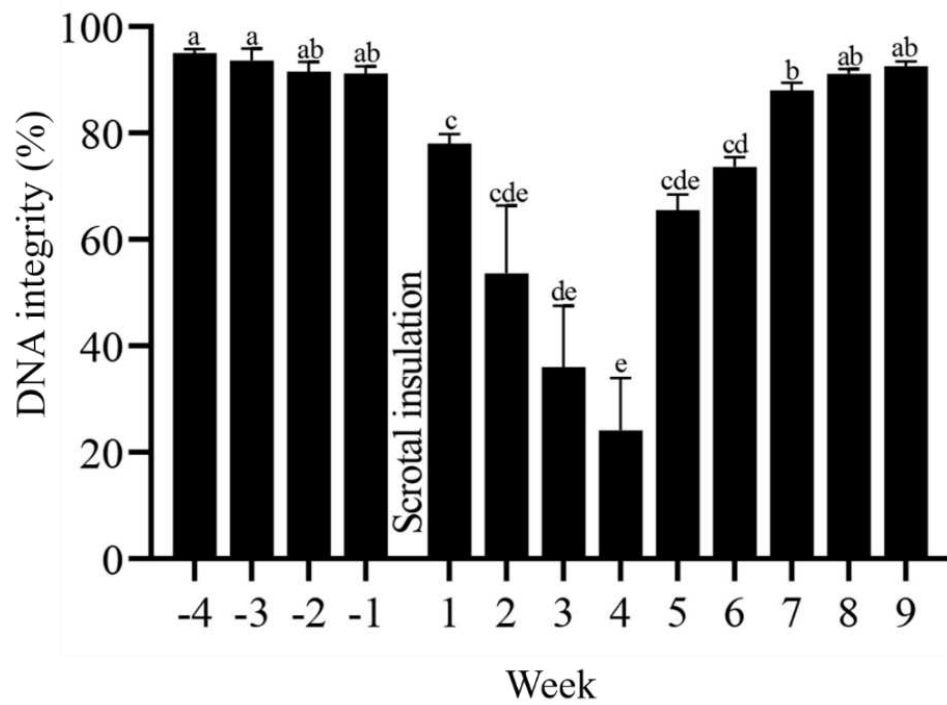
Figura 13 — Defeitos acrossômicos (A), gota citoplasmática proximal (B), cauda enrolada ao redor da cabeça (C), defeitos de peça intermediária (D), cabeça isolada patológica (E) e cauda fortemente enrolada ou dobrada (F) dos espermatozoides de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



4.8 Integridade do DNA espermático

A integridade do DNA espermático foi reduzida na semana 1 ($78,1 \pm 1,7\%$; $p < 0,05$) em comparação ao período pré-insulação ($92,9 \pm 1,5\%$). O menor valor foi registrado na semana 4 ($24,1 \pm 9,8\%$), com retorno aos níveis de referência na semana 7, quando $88,1 \pm 1,4\%$ das células espermáticas apresentaram DNA íntegro (Figura 14).

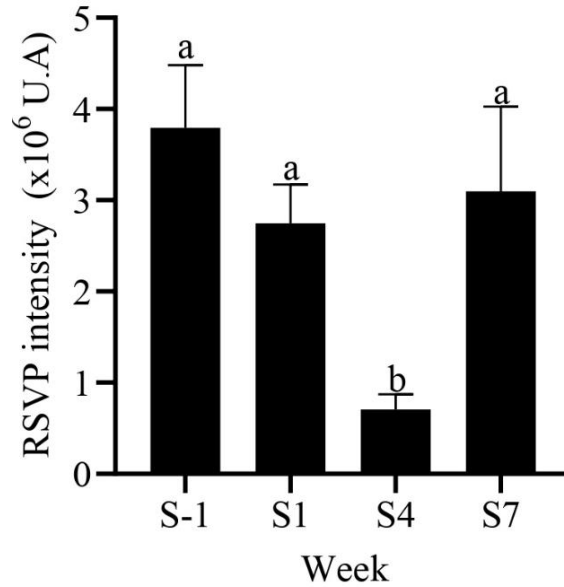
Figura 14 — Integridade do DNA espermático de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. As semanas -4 a -1 correspondem ao período pré-insulação (controle), e as semanas 1 a 9 ao período pós-insulação. A insulação escrotal teve duração de sete dias (semanas -1 a 1). Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



4.9 Padrão de ligação das RSVPs aos espermatozoides

A análise do padrão de ligação e da intensidade de fluorescência (FITC) demonstrou que a insulação escrotal modificou a ligação das RSVPs aos espermatozoides. A intensidade de fluorescência diminuiu de $3,8 \pm 0,7 \times 10^6$ UA no período pré-insulação (Semana -1) para $0,7 \pm 0,2 \times 10^6$ UA na semana 4 ($p < 0,05$), retornando aos níveis de referência apenas na semana 7 ($3,1 \pm 0,9 \times 10^6$ UA; $p > 0,05$; Figura 15).

Figura 15 — Intensidade média de fluorescência (FITC) da ligação das *Ram Seminal Vesicle Protein* (RSVPs) aos espermatozoides de carneiros deslanados submetidos à insulação escrotal. Os valores representam a média de sete carneiros (\pm EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



4.10 Caracterização de grupos de carneiros com diferentes perfis de termotolerância

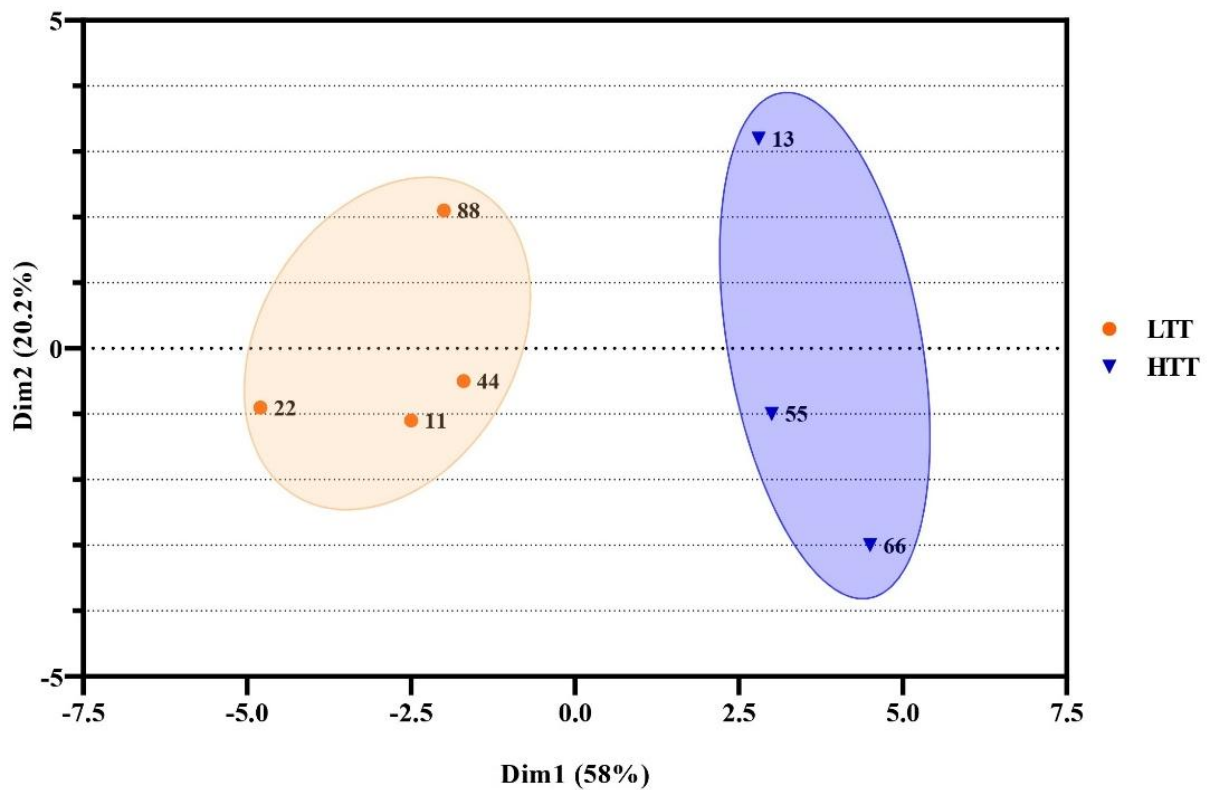
Nesse estudo, as diferenças interindividuais observadas nas respostas reprodutivas dos animais ao estresse térmico induzido pela insulação escrotal evidenciaram a existência de padrões distintos de tolerância ao calor, permitindo a definição de dois grupos fenotípicos: alta (HTT) e baixa (LTT) termotolerância. A classificação foi realizada por meio de análise de componentes principais utilizando as respostas reprodutivas da quarta semana pós-insulação (Figura 16), período considerado crítico para a manifestação dos efeitos deletérios do estresse térmico sobre a espermatogênese, em função do tempo necessário para o comprometimento das células germinativas em estágios sensíveis ao aumento da temperatura testicular.

Os dois primeiros componentes principais explicaram 78,0% da variância total dos dados (58,0% e 20,2%, respectivamente), indicando adequada representação multivariada das variáveis analisadas. O primeiro componente apresentou forte associação com parâmetros relacionados à qualidade espermática global, incluindo motilidade espermática, concentração, integridade do DNA e viabilidade celular, enquanto o segundo componente esteve predominantemente relacionado às características morfológicas espermáticas, especialmente à ocorrência de defeitos maiores, além de parâmetros de deslocamento espermático. Essa estrutura multivariada evidenciou clara separação entre os grupos HTT e LTT, corroborando a existência de heterogeneidade fenotípica na resposta ao estresse térmico testicular.

A análise longitudinal subsequente não revelou interação significativa entre semana e grupo ($p > 0,05$), indicando que as diferenças observadas entre HTT e LTT representaram efeitos principais consistentes ao longo de todo o período experimental. Dessa forma, as médias dos parâmetros seminais foram estimadas considerando conjuntamente todas as avaliações

realizadas ao longo do estudo, abrangendo tanto o período pré-insulação (Fase I) quanto o período pós-insulação (Fase III), permitindo uma comparação integrada entre os fenótipos de termotolerância.

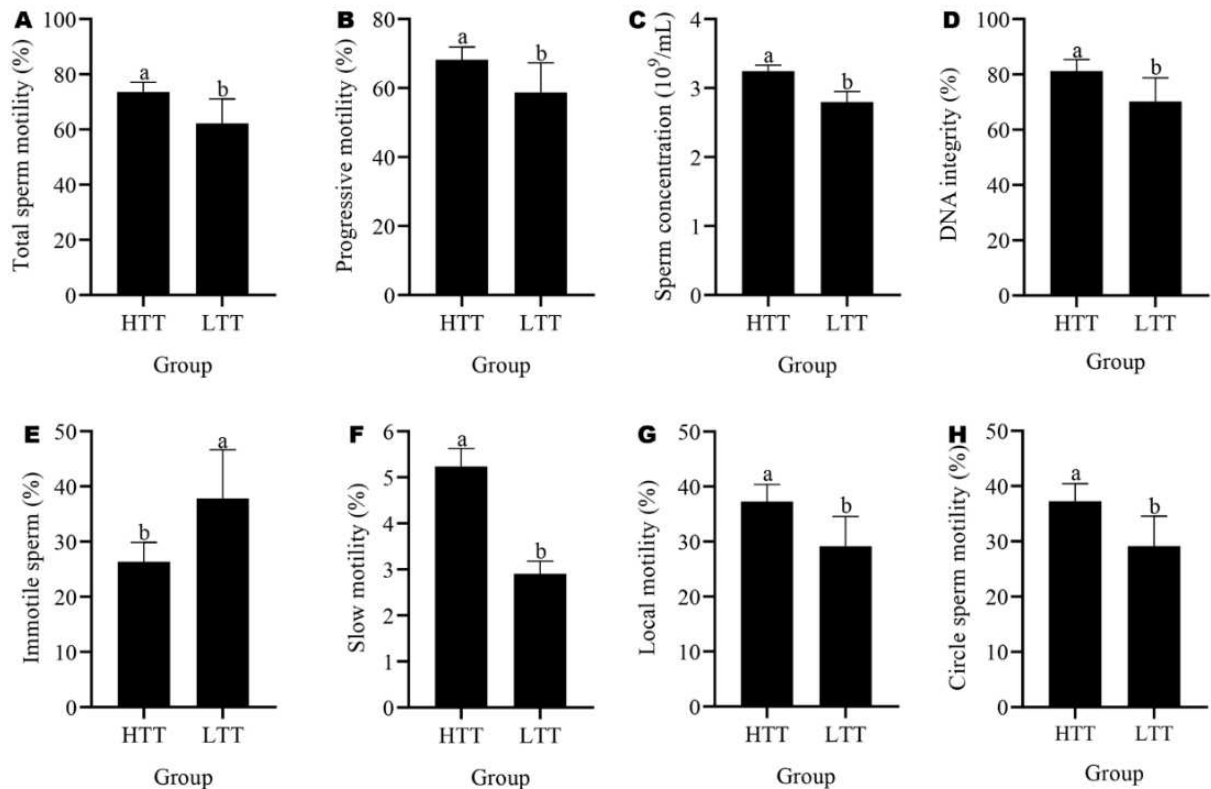
Figura 16 — Classificação de carneiros deslanados em fenótipos de alta (HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância por análise de componentes principais (PCA), com base em parâmetros reprodutivos da quarta semana pós-insulação. Os dois primeiros componentes principais explicam 78,0% da variância total (58,0% e 20,2%, respectivamente).



Os animais classificados como HTT apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) para motilidade total ($73,6 \pm 2,7\%$ vs. $62,2 \pm 4,7\%$ nos LTT), motilidade progressiva ($68,2 \pm 2,9\%$ vs. $58,7 \pm 4,5\%$), motilidade lenta ($5,2 \pm 0,4\%$ vs. $2,9 \pm 0,2\%$), motilidade circular ($37,3 \pm 2,3\%$ vs. $29,1 \pm 2,8\%$), motilidade local ($4,9 \pm 0,4\%$ vs. $3,4 \pm 0,3\%$), concentração espermática ($3,2 \pm 0,07 \times 10^9$ SPZs/mL vs. $2,8 \pm 0,1 \times 10^9$ SPZs/mL) e integridade do DNA ($81,2 \pm 2,6\%$ vs. $70,2 \pm 4,4\%$), quando comparados ao grupo LTT. Em relação à porcentagem de espermatozoides imóveis, observou-se maior valor nos animais LTT ($37,8 \pm 4,7\%$) em relação aos HTT ($26,4 \pm 2,7\%$; $p < 0,05$; Figura 17A–H).

Figura 17 — Parâmetros espermáticos de carneiros deslanados classificados em alta (HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância. As médias foram estimadas por modelos mistos considerando todas as semanas do estudo,

devido à ausência de interação significativa entre semana e grupo ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Resultados expressos como média \pm EPM.



As análises através dos modelos estatísticos não detectaram diferenças entre os grupos de carneiros HTT e LTT ($p > 0,05$) para VCL, VSL, DCL, DSL, DAP, VAP (Figura 18), bem como para circunferência escrotal, viabilidade, motilidade rápida, espermatozoides normais, defeitos maiores e defeitos menores ($p > 0,05$; Figura 19).

Figura 18 — Parâmetros espermáticos de carneiros deslanados classificados em alta (HTT, $n = 3$) e baixa (LTT, $n = 4$) termotolerância. As médias foram estimadas por modelos mistos considerando todas as semanas do estudo, devido à ausência de interação significativa entre semana e grupo ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Resultados expressos como média \pm EPM.

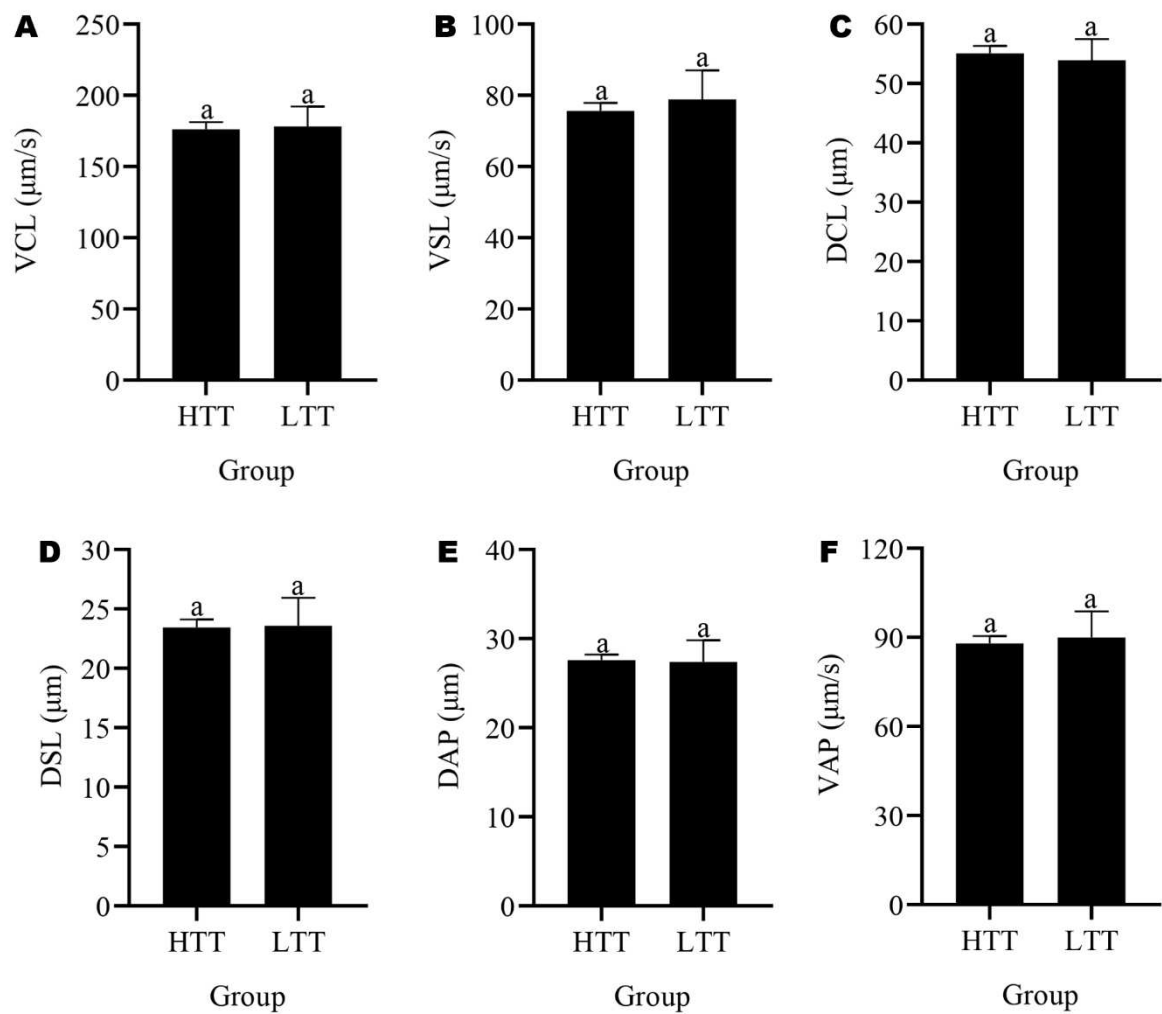
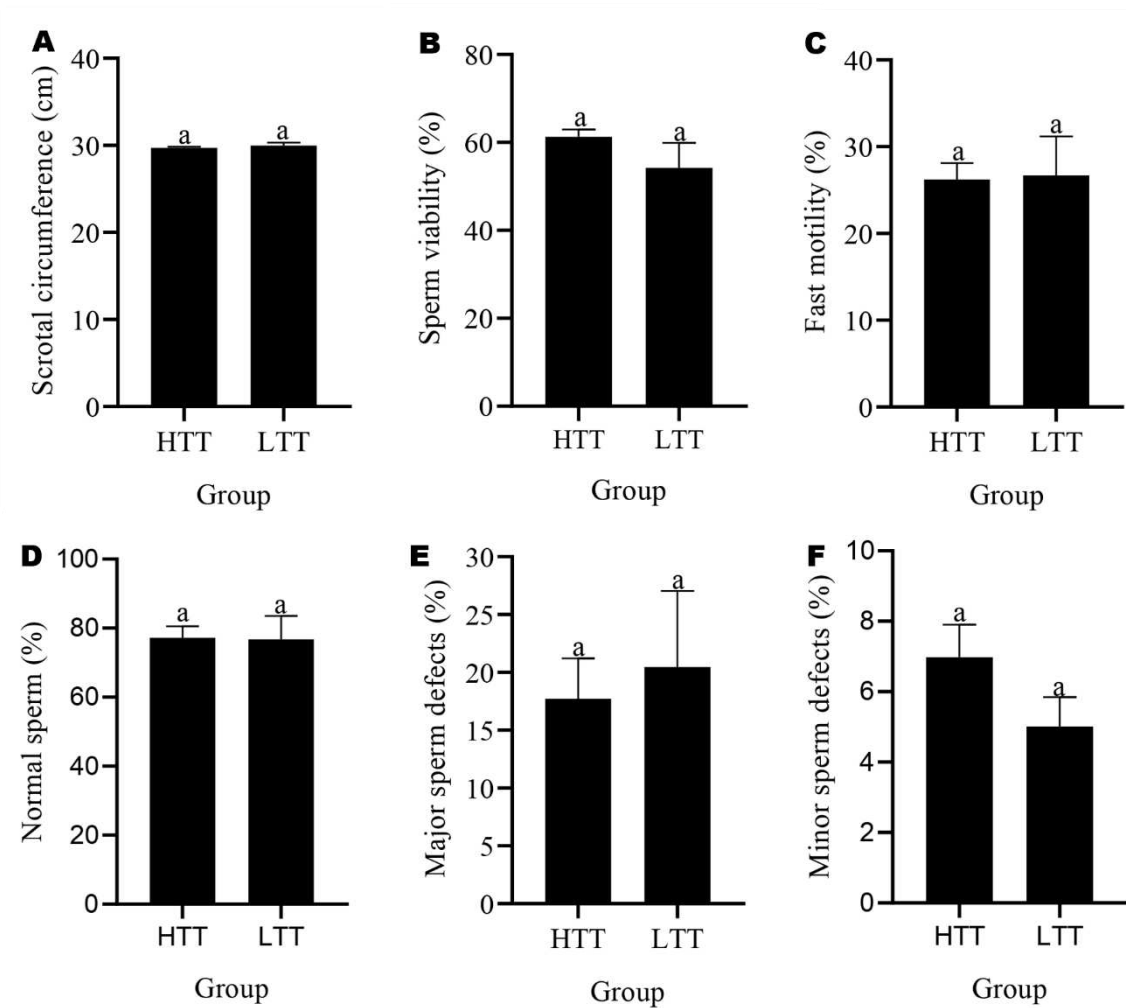


Figura 19 — Parâmetros espermáticos de carneiros deslanados classificados em alta (HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância. As médias foram estimadas por modelos mistos considerando todas as semanas do estudo, devido à ausência de interação significativa entre semana e grupo ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Resultados expressos como média \pm EPM.



Após a classificação dos animais em grupos de baixa (LTT; $n = 4$) e alta (HTT; $n = 3$) termotolerância, as mensurações realizadas na Fase II (D2 e D4) foram definidas como período de interesse para a análise das variáveis térmicas. Foram calculadas, para cada grupo, as médias da temperatura retal, da temperatura do globo ocular, da temperatura da superfície escrotal e da temperatura da cauda do epidídimo, bem como dos gradientes térmicos TOG–TSST, TOG–STEP, RT–TSST e RT–STEP, com base nos valores registrados no segundo (D2) e no quarto (D4) dia de insulação escrotal. Essas médias foram utilizadas para a comparação entre os grupos LTT e HTT (Tabela 3).

Tabela 3 — Variáveis e gradientes térmicos de carneiros deslançados com alta (HTT, $n = 3$) e baixa (LTT, $n = 4$) termotolerância após sete dias de insulação escrotal. As variáveis incluem temperatura retal (RT), do globo ocular (TOG), da superfície escrotal (TSST) e da cauda do epidídimo (STEP), bem como os gradientes térmicos TOG–TSST, TOG–STEP, RT–TSST e RT–STEP. Os valores representam médias obtidas nos dias 2 (D2) e 4 (D4) da insulação escrotal (Fase II).

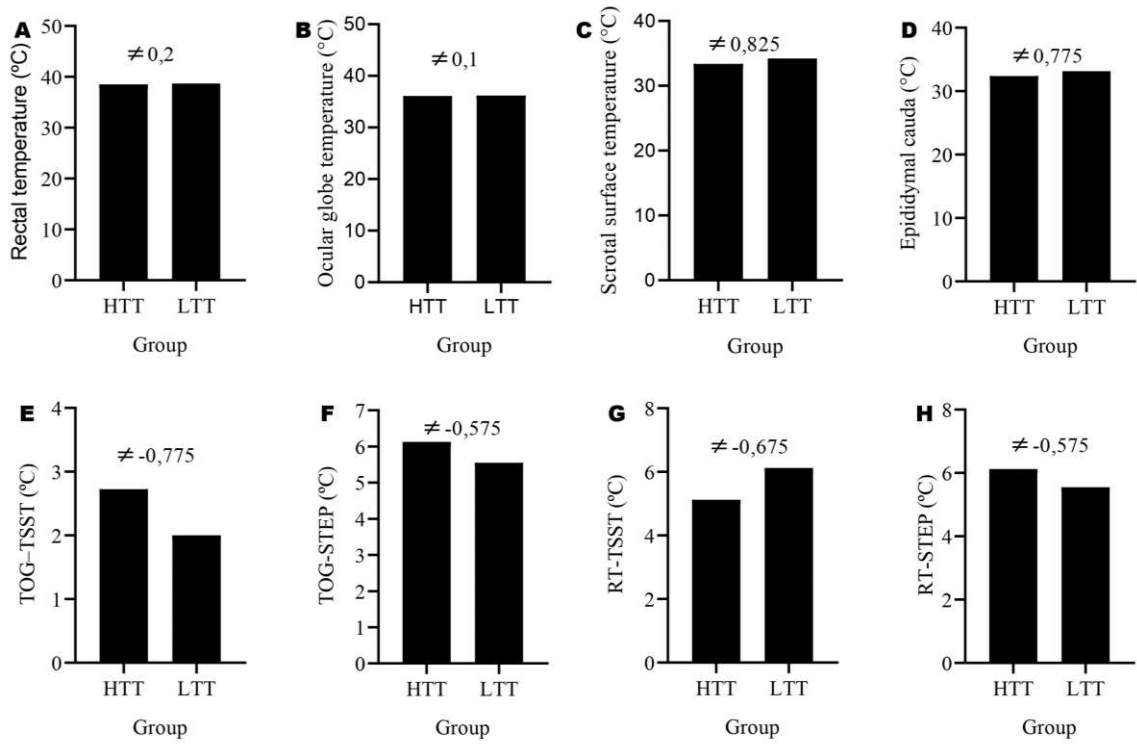
Group	Temperatures (°C)				Thermal gradients (°C)			
	RT	TOG	TSST	STEP	TOG-TSST	RT-TSST	TOG-STEP	RT-STEP
LTT	38,7	36,20	34,20	33,15	2,00	4,50	3,05	5,55
HTT	38,5	36,10	33,38	32,38	2,73	5,13	3,73	6,13

RT = temperatura retal; TOG = temperatura do globo ocular; TSST = temperatura da superfície escrotal; STEP = temperatura da cauda do epidídimo. Os gradientes térmicos foram calculados como diferenças entre as variáveis de temperatura. Os valores representam as médias da Fase II (dias 2 e 4 da insulação escrotal).

As diferenças numéricas entre os grupos foram discretas para a temperatura retal (38,7 °C em LTT vs 38,5 °C em HTT; $\Delta = 0,2$ °C) e para a temperatura do globo ocular (36,2 °C em LTT vs 36,1 °C em HTT; $\Delta = 0,1$ °C). Em contraste, diferenças numéricas mais pronunciadas foram observadas para as variáveis associadas à superfície escrotal, com valores médios superiores nos animais classificados como de baixa termotolerância (LTT) em relação aos de alta termotolerância (HTT), incluindo a temperatura da superfície escrotal (34,20 vs 33,38 °C; $\Delta = 0,82$ °C) e a temperatura superficial da cauda do epidídimo (33,15 vs 32,38 °C; $\Delta = 0,77$ °C). Não foram aplicados testes estatísticos para essas comparações.

Quanto aos gradientes térmicos, os animais classificados como de alta termotolerância (HTT) apresentaram valores numericamente superiores aos observados nos animais de baixa termotolerância (LTT). Os gradientes TOG-TSST, TOG-STEP, RT-TSST e RT-STEP foram, respectivamente, 0,72; 0,67; 0,62 e 0,57 °C mais elevados nos animais HTT, correspondendo a valores de 2,73 vs 2,00 °C, 3,73 vs 3,05 °C, 5,13 vs 4,50 °C e 6,13 vs 5,55 °C para HTT e LTT, respectivamente, sem realização de análise estatística (Figura 20A-H).

Figura 20 — Variáveis e gradientes térmicos de carneiros deslanados com alta (HTT, n = 3) e baixa (LTT, n = 4) termotolerância após sete dias de insulação escrotal. São apresentadas as seguintes variáveis: (A) temperatura retal (RT), (B) temperatura do globo ocular (TOG), (C) temperatura da superfície escrotal (TSST), (D) temperatura da cauda do epidídimo (STEP), e os gradientes térmicos (E) TOG-TSST, (F) TOG-STEP, (G) RT-TSST e (H) RT-STEP. Os valores representam médias obtidas nos dias 2 (D2) e 4 (D4) da insulação escrotal (Fase II), e as diferenças indicadas acima das barras representam apenas diferenças entre médias (LTT - HTT), sem análise estatística inferencial.



5 DISCUSSÃO

Em consonância com o objetivo deste estudo, os resultados demonstram que o estresse térmico induzido por insulação escrotal compromete a termorregulação escrotal, bem como afeta de forma integrada as características espermáticas e os parâmetros reprodutivos de carneiros deslanados da raça Morada Nova. A elevação da temperatura escrotal, acompanhada da redução dos gradientes térmicos entre as temperaturas corporais e escrotais, esteve associada a alterações consistentes na qualidade seminal, evidenciadas por mudanças na cinética espermática, na morfologia, na integridade do DNA e na interação proteína-espermatozoide, além de variações na circunferência escrotal, mesmo em uma raça reconhecidamente adaptada a ambientes quentes.

Durante a fase de insulação escrotal, a temperatura do microclima formado entre a bolsa de insulação e a pele escrotal acompanhou o padrão de variação térmica diária, com elevação mais acentuada no período da tarde e redução inicial no início da noite. Apesar dessas oscilações, as médias mantiveram-se consistentemente elevadas, em torno de 34–35 °C, com baixa variabilidade entre indivíduos, evidenciando estabilidade térmica ao longo do período de insulação. Adicionalmente, observou-se que, após pequenas reduções noturnas, a temperatura voltou a se elevar a partir do final da tarde, atingindo picos após as 22:00 h. Em conjunto, esses achados indicam que o modelo experimental foi eficaz em promover elevação térmica escrotal sustentada e biologicamente relevante, mantendo um estímulo térmico contínuo mesmo durante o período noturno. A persistência de valores elevados sugere um efeito combinado das condições ambientais e da limitação dos mecanismos fisiológicos de dissipação de calor imposta pelo dispositivo de insulação. Esse comportamento é consistente com Shahat, Thundathil e Kastelic (2021), que também observaram picos noturnos na temperatura subcutânea escrotal, iniciando por volta das 20:00 h e atingindo máximos próximos à meia-noite, possivelmente refletindo uma dinâmica térmica fisiológica em ruminantes, embora os mecanismos subjacentes ainda não estejam completamente esclarecidos.

A temperatura corporal dos animais, estimada por meio da temperatura retal e da temperatura do globo ocular, manteve-se relativamente estável ao longo do período experimental. Esse resultado indica que, nas condições adotadas, a insulação escrotal não promoveu alterações sistêmicas na homeotermia, restringindo seus efeitos principalmente ao escroto, em concordância com estudos que descrevem o caráter predominantemente local desse modelo de estresse térmico (VIEIRA NETO et al., 2021; TEIXEIRA et al., 2025). Essa interpretação é reforçada pelo aumento observado especificamente na temperatura da superfície

escrotal e na temperatura da superfície da cauda do epidídimo durante a Fase II, correspondente ao período de insulação. Foram registrados incrementos médios de 0,75 °C e 0,90 °C, respectivamente, demonstrando que elevações discretas, porém sustentadas, da temperatura escrotal podem ser suficientes para perturbar a homeotermia testicular e comprometer a qualidade espermática em ovinos criados sob condições semiáridas tropicais do Brasil.

A manutenção da temperatura corporal associada à elevação das temperaturas escrotais resultou em redução do gradiente térmico entre o corpo e o escroto. Embora a temperatura retal não tenha sido mensurada com o mesmo equipamento utilizado para as aferições escrotais e do globo ocular, esse gradiente é amplamente aceito como indicador da eficiência da termorregulação escrotal e de seus efeitos sobre as características espermáticas (GONÇALVES et al., 2021), reconhecidamente sensíveis à elevação térmica (TEIXEIRA et al., 2025). De forma consistente, o gradiente entre a temperatura do globo ocular e as temperaturas escrotais, variáveis obtidas com o mesmo equipamento, também apresentou redução durante a fase de insulação. Evidências experimentais mostram que o aumento da temperatura escrotal, em modelos naturais ou induzidos de hipertermia, reduz o gradiente térmico entre corpo e escroto e compromete a eficiência da termorregulação escrotal, estando associado ao aumento de anormalidades espermáticas (AHIRWAR et al., 2018) e a alterações no padrão de motilidade (MENEGASSI et al., 2018). No presente estudo, embora os gradientes tenham apresentado discreta reaproximação aos valores pré-insulação já na primeira semana pós-insulação, a elevação térmica observada durante a Fase II parece ter sido suficiente para impactar a espermatogênese e reduzir a qualidade seminal dos animais.

Os resultados demonstram que o estresse térmico induzido por insulação escrotal comprometeu de forma consistente as variáveis cinéticas do ejaculado, com destaque para as motilidades total e progressiva. Ambas apresentaram declínio já a partir da segunda semana pós-insulação, com reduções relativas de aproximadamente 52,3% e 52,4%, respectivamente, em relação aos valores pré-insulação, atingindo os menores valores em torno da quarta semana e permanecendo abaixo dos padrões de referência até a quinta semana, com recuperação gradual observada apenas a partir da sexta semana. Esse padrão temporal sugere que o aumento da temperatura escrotal tenha afetado tanto espermatozoides já formados quanto células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese. Outros parâmetros cinéticos também foram alterados ao longo do período pós-insulação, incluindo a velocidade curvilínea, a motilidade circular e a proporção de espermatozoides imóveis. A velocidade curvilínea apresentou redução expressiva na terceira semana, enquanto na quarta semana observou-se aumento acentuado da imotilidade espermática, concomitantemente à redução da motilidade

circular. Embora a motilidade circular represente um padrão de deslocamento funcionalmente indesejável (TUFONI et al., 2024), sua redução no presente estudo parece refletir principalmente a redução da motilidade espermática total, e não uma modulação seletiva desse padrão de movimento entre as células móveis, devendo, portanto, ser interpretada como consequência indireta do comprometimento da cinética espermática induzido pelo estresse térmico.

Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, Rocha et al. (2015) relataram efeitos severos da elevação da temperatura escrotal em ovinos submetidos à insulação contínua por oito dias consecutivos, com ocorrência de azoospermia entre os dias 29 e 71 pós-insulação e recuperação espermatogênica observada apenas após 113 dias. De forma semelhante, Viana Neto et al. (2024), utilizando um modelo de insulação escrotal intermitente durante quatro noites, observaram redução completa da motilidade espermática (0%) entre os dias 23 e 37 do experimento, com restabelecimento das características espermáticas apenas no dia 77. Em conjunto, esses resultados indicam que diferentes modelos de estresse térmico escrotal em ovinos promovem danos persistentes à função espermática, com recuperação tardia após a retirada do estímulo térmico, refletindo a sensibilidade do eixo testículo–epidídimo ao calor.

Esses efeitos deletérios são frequentemente associados ao aumento da produção de EROs, reconhecido como um dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos no estresse térmico testicular (MOENIAN et al., 2024). A elevada sensibilidade das células germinativas ao estresse térmico decorre, em grande parte, do intenso processo de diferenciação celular ao longo da espermatogênese, associado à elevada complexidade metabólica e estrutural dessas células, bem como à elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas, o que as torna particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica (AITKEN et al., 2016; COLLODEL et al., 2022), podendo resultar em alterações estruturais da membrana plasmática e acrossomal e no comprometimento do potencial de membrana mitocondrial (ALVES et al., 2021; GARCIA-OLIVEROS et al., 2022), contribuindo para os prejuízos observados nos parâmetros cinéticos sob condições de estresse térmico.

No que se refere à morfologia espermática, observou-se que a incidência de defeitos espermáticos maiores permaneceu elevada entre a terceira e a sétima semana pós-insulação, com retorno aos valores de referência apenas na oitava semana. Na quinta semana pós-insulação, aproximadamente 53,9% dos espermatozoides apresentavam defeitos maiores, enquanto apenas 43% foram classificados como morfologicamente normais. A persistência dessas alterações ao longo do período pós-insulação indica que os efeitos do estresse térmico induzido por insulação escrotal não se restringem a danos transitórios no ejaculado, mas

refletem comprometimentos ocorridos durante diferentes estágios da espermatogênese. De forma consistente, a análise dos defeitos morfológicos específicos evidenciou um padrão temporal progressivo, caracterizado pela manifestação precoce de defeitos acrossômicos, gota citoplasmática proximal e cauda enrolada ao redor da cabeça, a partir da terceira semana pós-insulação, seguida pelo aumento tardio de defeitos da peça intermediária, cauda fortemente enrolada e cabeça isolada patológica nas semanas subsequentes. Esses achados estão em consonância com estudos que demonstram os efeitos da hipertermia testicular sobre a morfologia dos espermatozoides epididimários, bem como sobre a espermiogênese e outras fases do desenvolvimento das células germinativas (ALVES et al., 2021; GARCIA-OLIVEROS et al., 2022; TEIXEIRA et al., 2025). Embora possa haver recuperação parcial da proporção de espermatozoides morfológicamente normais em fases intermediárias, a normalização completa do perfil morfológico parece depender da renovação integral da população espermática formada sob condições de estresse térmico. Em ovinos, o ciclo completo da espermatogênese dura aproximadamente 42 a 53 dias (CARDOSO; QUEIROZ, 1988), o que corrobora o intervalo necessário para o restabelecimento pleno das características morfológicas observado neste estudo, em consonância com os achados de Alves et al. (2016), que relataram recuperação da morfologia espermática normal apenas no 63º dia após a insulação escrotal. Evidências em outras espécies também indicam que a hipertermia testicular está associada ao aumento persistente de defeitos morfológicos, incluindo alterações acrossômicas, defeitos da peça intermediária, presença de gotas citoplasmáticas e defeitos de cauda (GARCIA-OLIVEROS et al., 2022). Esses danos morfológicos prolongados podem estar relacionados, ao menos em parte, à desorganização do epitélio seminífero, uma vez que o estresse térmico pode comprometer a integridade da barreira hematotesticular por meio da redução da expressão de proteínas de junção, como ocludina e ZO-1, além de induzir disfunções nas células de Sertoli (CAO et al., 2023; WEN et al., 2025). A ruptura desse microambiente protegido favorece prejuízos às células germinativas, reforçando a hipótese de que a hipertermia testicular exerce impacto prolongado sobre a espermatogênese e a morfologia espermática, possivelmente mediado pelo aumento do estresse oxidativo.

O comprometimento precoce da integridade do DNA espermático, observado já na primeira semana pós-insulação, indica que o estresse térmico afeta não apenas células germinativas em processo de diferenciação, mas também espermatozoides já formados e armazenados no epidídimo. Esse achado é consistente com o estudo de Viana Neto et al. (2024), que relataram redução imediata da integridade do DNA espermático sete dias após a submissão de ovinos Morada Nova a quatro noites consecutivas de insulação escrotal, evidenciando a

rápida resposta do genoma espermático à hipertermia testicular. No presente estudo, o pico de fragmentação observado na quarta semana coincidiu com o período de maior comprometimento das demais variáveis reprodutivas, caracterizando esse intervalo como um ponto crítico para os efeitos deletérios do calor, em consonância com evidências de que o estresse térmico compromete simultaneamente a cinética, a morfologia e a integridade genômica dos espermatozoides (VIANA NETO et al., 2024; TEIXEIRA et al., 2025). Diferentemente de Viana Neto et al. (2024), que observaram manutenção de elevados índices de fragmentação do DNA por até 120 dias após a insulação, neste estudo a integridade do DNA espermático retornou aos níveis pré-insulação aproximadamente sete semanas após o término do estresse térmico. Essa divergência sugere que o modelo experimental adotado induziu um estresse térmico de intensidade moderada, favorecendo a reversibilidade dos danos genômicos após a substituição progressiva dos espermatozoides danificados por células recém-formadas ao longo do ciclo espermato gênico.

No presente estudo, observou-se um aumento transitório da circunferência escrotal imediatamente após a remoção da bolsa de insulação, com incremento aproximado de 1,2 cm em relação ao período pré-insulação, seguido de redução na terceira semana pós-insulação, sugerindo a progressão de eventos inflamatórios iniciais para alterações degenerativas no tecido testicular. Esse achado é consistente com resultados previamente reportados pelo nosso grupo, que também descreveram aumento imediato da circunferência escrotal em ovinos submetidos à insulação escrotal (MOREIRA et al., 2001; ROCHA et al., 2015; VIANA NETO et al., 2024). O aumento inicial dessa medida é classicamente atribuído à formação de edema e à resposta inflamatória local induzida pela hipertermia testicular (SHAHA; TRIPATHI; MISHRA, 2010; NGUYEN-THANH et al., 2022). Por outro lado, o declínio observado nas semanas subsequentes, particularmente na terceira semana pós-insulação, pode estar associado à perda de massa testicular decorrente do aumento da apoptose germinativa, de disfunções nas células de Sertoli e Leydig e da desorganização do epitélio seminífero, processos amplamente relacionados ao estresse oxidativo induzido pelo calor, que culminam em prejuízos à função testicular (LIU et al., 2022; MOENIAN et al., 2024; WEN et al., 2025).

A análise imunocitoquímica do padrão de ligação das RSVPs aos espermatozoides indicou que o estresse térmico comprometeu a interação dessas proteínas com a superfície celular. As RSVPs estão entre os componentes mais abundantes do plasma seminal ovino e exercem funções relevantes na estabilidade de membrana, proteção espermática e eventos associados à capacitação e ao reconhecimento celular no trato reprodutivo feminino (SOUZA et al., 2012; Rodriguez-Villamil et al., 2016). Assim, alterações em seu padrão de ligação

podem indicar comprometimento funcional, uma vez que a associação eficiente entre proteínas seminais e a membrana espermática é fundamental para a manutenção do potencial fertilizante. A redução na intensidade de fluorescência observada no período crítico pós-insulação está em consonância com Viana Neto et al. (2024), que relataram diminuição no percentual de células imunomarcadas após a insulação escrotal, sem alterações concomitantes no conteúdo total de RSVPs no plasma seminal. Esses achados sugerem que o estresse térmico pode não afetar diretamente a quantidade dessas proteínas, mas sim sua capacidade de interação com a superfície espermática, possivelmente em decorrência de alterações estruturais induzidas pelo calor. Adicionalmente, estudos prévios demonstram que reduções no conteúdo de proteínas do plasma seminal podem ocorrer apenas em fases mais tardias do período pós-estresse, quando os parâmetros reprodutivos já se encontram restabelecidos (ROCHA et al., 2015). Em conjunto, esses achados indicam que a diminuição da ligação das RSVPs pode estar relacionada a modificações precoces na membrana plasmática espermática, especialmente em seus componentes lipídicos e proteicos, que determinam os sítios de ancoragem e interação molecular. Nesse sentido, a literatura descreve que a peroxidação lipídica resultante do excesso de espécies reativas de oxigênio pode alterar a organização da bicamada lipídica e comprometer a estabilidade de microdomínios de membrana, afetando diretamente a interação proteína-espermatozoide. Como a integridade da membrana é determinante para processos como motilidade, capacitação e reação acrossômica, tais alterações podem reduzir a ligação eficiente de proteínas seminais abundantes como as RSVPs e, conseqüentemente, comprometer mecanismos essenciais à funcionalidade e à viabilidade espermática (AITKEN; BAKER, 2006; GIROUARD; FRENETTE; SULLIVAN, 2008).

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as fases experimentais para algumas variáveis reprodutivas, como concentração espermática, viabilidade e defeitos menores, embora estudos prévios tenham descrito alterações nesses parâmetros após insulação escrotal em diferentes modelos experimentais (PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUTIÉRREZ-ADÁN, 2008; ROCHA et al., 2015; VIANA NETO et al., 2024). Ainda assim, verificou-se uma tendência de queda desses indicadores nas semanas subsequentes à insulação, acompanhando o padrão de piora observado para as demais variáveis reprodutivas avaliadas. A ausência de significância estatística, associada ao elevado erro padrão da média, sugere variabilidade individual na resposta ao estresse térmico, possivelmente relacionada ao caráter moderado do modelo experimental e ao número amostral reduzido, os quais podem ter favorecido a manifestação de diferentes níveis de termotolerância escrotal entre os animais. Diante desse cenário, a análise de componentes principais foi empregada como

abordagem exploratória para identificar padrões biológicos subjacentes à resposta reprodutiva ao calor no período crítico pós-insulação, permitindo a organização dos animais em perfis de sensibilidade térmica distinta, sem a pretensão de definir fenótipos consolidados de termotolerância. Nesse agrupamento exploratório, o perfil menos afetado (HTT) apresentou melhores índices de motilidade total e progressiva, menor proporção de espermatozoides imóveis, maior concentração espermática e melhor integridade do DNA, em comparação ao perfil mais afetado (LTT). Em conjunto, esses achados reforçam a relevância da variabilidade individual como moduladora da intensidade dos efeitos do estresse térmico sobre as células espermáticas e destacam a termotolerância como um fator a ser considerado em futuros estudos que utilizem modelos de estresse térmico moderado, além de apontarem perspectivas para investigações voltadas à caracterização de fenótipos termotolerantes e à elucidação dos mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares envolvidos nesse processo.

Em síntese, os resultados deste estudo evidenciam que o modelo de estresse térmico moderado induzido por insulação escrotal compromete de forma consistente a funcionalidade do eixo testículo–epidídimo, confirmando a elevada sensibilidade desse sistema ao insulto térmico. Tal sensibilidade é sustentada pelos efeitos diretos da hipertermia testicular sobre a estrutura e a função dos espermatozoides, expressos por alterações nos parâmetros cinéticos, morfológicos e genômicos, bem como na interação entre proteínas do plasma seminal e a superfície celular espermática, além de modificações nas medidas de circunferência escrotal. Esses achados demonstram que, mesmo em raças reconhecidas por sua adaptabilidade a ambientes termicamente desafiadores, como a Morada Nova, o estresse térmico moderado é suficiente para comprometer o potencial reprodutivo. Ademais, a clara variabilidade individual observada, com a formação de grupos distintos quanto à sensibilidade ao calor, reforça a termotolerância como um fenótipo biológico ainda pouco explorado, cuja compreensão é estratégica para o avanço de programas de manejo e seleção de reprodutores frente aos desafios impostos pelas mudanças climáticas globais.

6 CONCLUSÃO

O estresse térmico induzido por sete dias de insulação escrotal comprometeu a termorregulação escrotal e desencadeou alterações reprodutivas em ovinos deslanados da raça Morada Nova. A elevação localizada da temperatura reduziu o gradiente térmico entre corpo e escroto, indicando menor eficiência termorregulatória, sem alterar a homeotermia sistêmica. O protocolo caracterizou um modelo de estresse térmico moderado, mas suficiente para provocar alterações funcionais e estruturais nos espermatozoides. O maior comprometimento ocorreu cerca de quatro semanas após a remoção do estímulo térmico, com impacto na cinética espermática, morfologia, integridade do DNA e interação entre proteínas seminais e espermatozoides. A variabilidade entre indivíduos indica diferentes perfis de termotolerância, mesmo em raça adaptada ao calor, e mostra que aumentos escrotais relativamente modestos já são suficientes para gerar prejuízos reprodutivos frente ao avanço dos desafios térmicos.

REFERÊNCIAS

- AHIRWAR, M. K. *et al.* Scrotal infrared digital thermography predicts effects of thermal stress on buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 78, p. 51-57, 2018. DOI 10.1016/j.jtherbio.2018.09.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.003>. Acesso em: 1 jan. 2026.
- AHMAD PARA, I. *et al.* Impact of heat stress on the reproduction of farm animals and strategies to ameliorate it. **Biological Rhythm Research**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 616-632, 2020. DOI 10.1080/09291016.2018.1548870. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09291016.2018.1548870>. Acesso em: 15 jun. 2025.
- AHMAD, G. *et al.* Mild induced testicular and epididymal hyperthermia alters sperm chromatin integrity in men. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 97, p. 546-553, 2012. DOI 10.1016/j.fertnstert.2011.12.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.025>. Acesso em: 18 jun. 2025.
- AITKEN, R. J. *et al.* Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 1-10, 2016. DOI 10.1071/RD15325. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD15325>. Acesso em: 12 jan. 2026.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 250, n. 1-2, p. 66-69, 2006. DOI 10.1016/j.mce.2005.12.026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>. Acesso em: 03 fev. 2026.
- ALDAHAN, R. A. *et al.* Acute heat-treatment disrupts inhibin-related protein production and gene expression in the adult rat testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 498, p. 110546, 2019. DOI 10.1016/j.mce.2019.110546. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110546>. Acesso em: 19 jan. 2026.
- ALLEN, J. D. *et al.* Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 118-127, 2015. DOI 10.3168/jds.2013-7704. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7704>. Acesso em: 18 jan. 2026.
- ALVES, M. B. R. *et al.* Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 747-755, 2016. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.02.034. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.034>. Acesso em: 23 jan. 2025.
- ALVES, M. B. R. *et al.* Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. **Theriogenology**, [s. l.], v. 161, p. 26-40, 2021. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.11.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.015>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. **Journal of Reproduction & Infertility**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 158-172, 2013.

BARRAGÁN, A. L. *et al.* Seasonal heat stress compromises testicular thermoregulation and semen quality of Dorper rams raised in a desert climate. **Journal of Thermal Biology**, [S. l.], v. 118, p. 103737, 2023. DOI 10.1016/j.jtherbio.2023.103737. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103737>. Acesso em: 14 set. 2025.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **The Canadian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 93-102, 1994.

BATES, D. *et al.* Fitting linear mixed-effects models using lme4. **Journal of Statistical Software**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 1-48, 2015. DOI 10.18637/jss.v067.i01. Disponível em: <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>. Acesso em: 23 jan. 2026.

BEN MOULA, A. *et al.* Heat stress and ram semen production and preservation: exploring impacts and effective strategies. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 119, p. 103794, 2024. DOI 10.1016/j.jtherbio.2024.103794. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2024.103794>. Acesso em: 13 jan. 2025.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinærmedicin**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

CAO, Y. *et al.* Dietary zinc may attenuate heat-induced testicular oxidative stress in mice via up-regulation of Cu-Zn SOD. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 16616-16626, 2015. DOI 10.4238/2015.December.11.9. Disponível em: <https://doi.org/10.4238/2015.December.11.9>. Acesso em: 24 mar. 2025.

CARDOSO, F. M.; QUEIROZ, G. F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 17, n. 1-2, p. 77-84, 1988. DOI 10.1016/0378-4320(88)90047-4. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(88\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(88)90047-4). Acesso em: 12 dez. 2025.

CHATTEN, A. *et al.* Predicting the effects of climate change on the fertility of aquatic animals using a meta-analytic approach. **Ecology Letters**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. e70054, 2025. DOI 10.1111/ele.70054. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ele.70054>. Acesso em: 28 dez. 2025.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual for andrological examination and evaluation of animal semen**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

COLLODEL, G. *et al.* Oxidation of polyunsaturated fatty acids as a promising area of research in infertility. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1002, 2022. DOI 10.3390/antiox11051002. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox11051002>. Acesso em: 02 fev. 2026.

CRUZ JÚNIOR, C. A. *et al.* Effects of testicle insulation on seminal traits in rams: preliminary study. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 130, p. 157-165, 2015. DOI 10.1016/j.smallrumres.2015.06.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.06.014>. Acesso em: 12 dez. 2024.

DA SILVA, M. V. *et al.* Spatial modeling via geostatistics and infrared thermography of the skin temperature of dairy cows in a compost barn system in the Brazilian semiarid region.

Smart Agricultural Technology, [s. l.], v. 3, p. 100078, 2023a. DOI 10.1016/j.atech.2022.100078. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atech.2022.100078>. Acesso em: 14 jan. 2026.

DA SILVA, M. V. *et al.* Vaginal temperature modeling in Holstein cows and cluster analysis by the cophenetic correlation coefficient. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 115, p. 103580, 2023b. DOI 10.1016/j.jtherbio.2023.103580. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103580>. Acesso em: 11 out. 2026.

E SILVA, T. P. D. *et al.* Effect of multiple stress factors (thermal, nutritional and pregnancy type) on adaptive capability of native ewes under semi-arid environment. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 59, p. 39-46, 2016. DOI 10.1016/j.jtherbio.2016.05.001. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.05.001>. Acesso em: 14 jan. 2026.

ESCOBAR, L. A. *et al.* Effect of γ -oryzanol on testicular degeneration induced by scrotal insulation in rams. **Theriogenology**, [s. l.], v. 140, p. 80-89, 2019. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.01.041. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.041>. Acesso em: 25 fev. 2025.

FERREIRA, N. C. R.; ANDRADE, R. R.; FERREIRA, L. N. Climate change impacts on livestock in Brazil. **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 68, n. 12, p. 2693-2704, 2024. DOI 10.1007/s00484-024-02778-3. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00484-024-02778-3>. Acesso em: 14 ago. 2025.

FERRER, M. S. *et al.* Changes in serum testosterone and anti-Müllerian hormone concentration in bulls undergoing scrotal insulation. **Domestic Animal Endocrinology**, [s. l.], v. 78, p. 106685, 2022. DOI 10.1016/j.domaniend.2021.106685. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106685>. Acesso em: 29 jun. 2025.

FONSÊCA, V. F. C. *et al.* Bio-thermal responses and heat balance of a hair coat sheep breed raised under an equatorial semi-arid environment. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 84, p. 83-91, 2019. DOI 10.1016/j.jtherbio.2019.05.024. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.05.024>. Acesso em: 21 jan. 2026.

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**, [s. l.], v. 106, p. 103237, 2022. DOI 10.1016/j.jtherbio.2022.103237. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103237>. Acesso em: 22 mai. 2025.

GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Seminal plasma proteins regulate the association of lipids and proteins within detergent-resistant membrane domains of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 921-931, 2008. DOI 10.1095/biolreprod.107.066514. Disponível em:

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066514>. Acesso em: 19 jan. 2026.

GONÇALVES, A. A. *et al.* Scrotal thermoregulation and sequential sperm abnormalities in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) under short-term heat stress. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 115, p. 103580, 2023b. DOI 10.1016/j.jtherbio.2023.103580. Disponível em:

l.], v. 96, p. 102842, 2021. DOI 10.1016/j.jtherbio.2021.102842. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102842>. Acesso em: 12 jul. 2026.

HALES, J. R. S.; KHOGALI, M.; FAWCETT, A. A.; MUSTAFA, M. K. Y. Circulatory changes associated with heat stroke: observations in an experimental animal model. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [*s. l.*], v. 14, n. 10, p. 761-777, 1987. DOI 10.1111/j.1440-1681.1987.tb01867.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1987.tb01867.x>. Acesso em: 21 jan. 2024.

HANDARINI, R. *et al.* Correlation of sperm motility, acrosome integrity, protamine deficiency, and DNA fragmentation in proven and unproven Friesian Holstein bulls. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, [*s. l.*], v. 11, n. 3, p. 796-802, 2024. DOI 10.5455/javar.2024.k831. Disponível em: <https://doi.org/10.5455/javar.2024.k831>. Acesso em: 13 jan. 2026.

HE, G. *et al.* Heat stress-induced dysbiosis of the gut microbiota impairs spermatogenesis by regulating secondary bile acid metabolism in the gut. **Science of the Total Environment**, [*s. l.*], v. 937, p. 173305, 2024. DOI 10.1016/j.scitotenv.2024.173305. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173305>. Acesso em: 21 fev. 2025.

HOTHORN, Torsten. **multcomp: simultaneous inference in general parametric models**. Version 1.4. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate Change 2021: The Physical Science Basis: contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2021. DOI 10.1017/9781009157896. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/9781009157896>. Acesso em: 21 jun. 2024.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate Change 2023: Synthesis Report: contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC, 2023. DOI 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

KAHWAGE, P. R. *et al.* High systemic and testicular thermolytic efficiency during heat tolerance test reflects better semen quality in rams of tropical breeds. **International Journal of Biometeorology**, [*s. l.*], v. 61, n. 10, p. 1819-1829, 2017. DOI 10.1007/s00484-017-1367-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1367-4>. Acesso em: 12 jan. 2026.

KANTER, M.; AKTAS, C.; ERBOGA, M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. **Toxicology and Industrial Health**, [*s. l.*], v. 29, n. 2, p. 99-113, 2013. DOI 10.1177/0748233711425082. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0748233711425082>. Acesso em: 03 jan. 2026.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; SAACKE, R. G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, [*s. l.*], v. 45, n. 5, p. 935-942, 1996. DOI 10.1016/0093-691X(96)00023-4. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00023-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00023-4). Acesso em: 25 mar. 2025.

- KASTELIC, J. P.; RIZZOTO, G.; THUNDATHIL, J. Review: testicular vascular cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen quality and sperm production in bulls. **Animal**, [s. l.], v. 12, n. s1, p. s133-s141, 2018. DOI 10.1017/S1751731118001167. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731118001167>. Acesso em: 12 jun. 2025.
- KASTELIC, J. P. *et al.* Pathogenesis and mitigation of the deleterious effects of heat stress on bull reproduction. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 518-524, 2021. DOI 10.21451/1809-3000.RBRA2021.070. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.070>. Acesso em: 30 abr. 2025.
- KASTELIC, J. P. *et al.* Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. **Veterinárni Medicína**, [s. l.], v. 62, n. 8, p. 437-442, 2017. DOI 10.17221/124/2016-VETMED. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/124/2016-VETMED>. Acesso em: 23 jun. 2025.
- KHAN, I. *et al.* Heat stress as a barrier to successful reproduction and potential alleviation strategies in cattle. **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 14, p. 2359, 2023. DOI 10.3390/ani13142359. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13142359>. Acesso em: 17 out. 2025.
- KIM, J.-H. *et al.* Testosterone production by a Leydig tumor cell line is suppressed by hyperthermia-induced endoplasmic reticulum stress in mice. **Life Sciences**, [s. l.], v. 146, p. 184-191, 2016. DOI 10.1016/j.lfs.2015.12.042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.042>. Acesso em: 19 set. 2026.
- KÖPPEN, W. Das geographische System der Klimate. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (ed.). **Handbuch der Klimatologie**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1936. v. 1, p. 1-44.
- LEITE, J. H. G. M. *et al.* Locally adapted Brazilian ewes with different coat colors maintain homeothermy during the year in an equatorial semiarid environment. **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 1635-1644, 2018. DOI 10.1007/s00484-018-1563-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1563-x>. Acesso em: 05 fev. 2026.
- LENTH, Russell V. **emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means**. R package version 1.8.5. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>. Acesso em: 22 nov. 2025.
- LI, N. *et al.* Review: automated techniques for monitoring the behaviour and welfare of broilers and laying hens: towards the goal of precision livestock farming. **Animal**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 617-625, 2020. DOI 10.1017/S1751731119002155. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731119002155>. Acesso em: 16 jan. 2025.
- LI, Z.; TIAN, J.; CUI, G.; WANG, M.; YU, D. Effects of local testicular heat treatment on Leydig cell hyperplasia and testosterone biosynthesis in rat testes. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 1424-1432, 2016. DOI 10.1071/RD14370. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD14370>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- LIU, Y. *et al.* Melatonin alleviates heat stress-induced testicular damage in dairy goats by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway. **Stress Biology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 47, 2022.

DOI 10.1007/s44154-022-00068-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00068-9>. Acesso em: 27 dez. 2025.

MADER, T. L.; DAVIS, M. S.; BROWN-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 712-719, 2006. DOI 10.2527/2006.843712x. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/2006.843712x>. Acesso em: 15 jan. 2025.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, [s. l.], v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999. DOI 10.1016/S0027-5107(99)00010-X. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X). Acesso em: 23 jul. 2025.

MASCARENHAS, N. M. H. *et al.* Thermal stress index for native sheep. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 115, p. 103607, 2023. DOI 10.1016/j.jtherbio.2023.103607. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103607>. Acesso em: 21 jan. 2026.

MENEGASSI, S. R. O. *et al.* Infrared thermography as a noninvasive method to assess scrotal insulation on sperm production in beef bulls. **Andrologia**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. e12904, 2018. DOI 10.1111/and.12904. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/and.12904>. Acesso em: 16 jan. 2025.

MOEINIAN, N. *et al.* The effects of vitamin C and vitamin B12 on improving spermatogenesis in mice subjected to long-term scrotal heat stress. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 334-343, 2024. DOI 10.5653/cerm.2023.06751. Disponível em: <https://doi.org/10.5653/cerm.2023.06751>. Acesso em: 17 fev. 2026.

MOHAMED, R. H. *et al.* Semen quality, testicular characteristic, biochemical profile and histopathology of testes of goats under heat stress conditions. **Assiut Veterinary Medical Journal**, [s. l.], v. 69, n. 176, p. 76-87, 2023. DOI 10.21608/avmj.2022.173957.1100. Disponível em: <https://doi.org/10.21608/avmj.2022.173957.1100>. Acesso em: 14 fev. 2025.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 1704-1711, 2001. DOI 10.1590/S1516-35982001000700007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000700007>. Acesso em: 12 jan. 2024.

NASRELDEEN, M. S. *et al.* Effect of selenium and zinc nanoparticles supplementations on testicular blood flow, semen, and reproductive hormones in Egyptian native goats subjected to ambient heat stress. **Domestic Animal Endocrinology**, [s. l.], v. 92, p. 106941, 2025. DOI 10.1016/j.domaniend.2025.106941. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2025.106941>. Acesso em: 15 mar. 2025.

NGUYEN-THANH, T. *et al.* Chronic scrotal heat stress causes testicular interstitial inflammation and fibrosis: an experimental study in mice. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 569-580, 2022. DOI 10.18502/ijrm.v20i7.11559. Disponível em: <https://doi.org/10.18502/ijrm.v20i7.11559>. Acesso em: 22 mar. 2025.

PAUL, C. *et al.* A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 73-84, 2008. DOI 10.1530/REP-08-0036. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-08-0036>. Acesso em: 18 set. 2025.

PEREIRA, A. M. F. *et al.* Thermoregulatory responses of heat acclimatized buffaloes to simulated heat waves. **Animals**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 756, 2020. DOI 10.3390/ani10050756. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10050756>. Acesso em: 14 set. 2025.

PEREIRA, E. S. *et al.* **Exigências nutricionais de caprinos e ovinos: BR-Caprinos & Ovinos**. São Carlos: Editora Scienza, 2024. 270 p. DOI 10.26626/9786556681849.2024B0001. Disponível em: <https://doi.org/10.26626/9786556681849.2024B0001>. Acesso em: 12 out. 2024.

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**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 40-47, 2008. DOI 10.1002/mrd.20759. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20759>. Acesso em: 14 fev. 2025.

REGO, J. P. A. *et al.* Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzerat bulls. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 94, n. 12, p. 5308-5320, 2016. DOI 10.2527/jas.2016-0811. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0811>. Acesso em: 17 abr. 2024.

RIZZOTO, G. *et al.* Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. **Theriogenology**, [s. l.], v. 152, p. 64-68, 2020. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.04.029. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.029>. Acesso em: 9 set. 2025.

ROCHA, D. R. *et al.* Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, [s. l.], v. 84, n. 8, p. 1291-1305, 2015. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.07.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.008>. Acesso em: 22 jan. 2024.

RODRIGUES, J. N. D. *et al.* Climatic seasons and time of the day influence thermoregulation and testicular hemodynamics in Santa Inês rams raised under humid tropical conditions. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 114, p. 103546, 2023. DOI 10.1016/j.jtherbio.2023.103546. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103546>. Acesso em: 14 nov. 2024.

SANTANA, T. C. *et al.* Ear back surface temperature of pigs as an indicator of comfort: spatial variability and its thermal implications. **AgriEngineering**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 266, 2025. DOI 10.3390/agriengineering7080266. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriengineering7080266>. Acesso em: 6 jan. 2026.

SEIXAS, L. *et al.* Heat tolerance in Brazilian hair sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 593-601, 2016. DOI 10.5713/ajas.16.0191. Disponível em: <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0191>. Acesso em: 28 mar. 2024.

SHAHA, C.; TRIPATHI, R.; MISHRA, D. P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 365, n. 1546, p. 1501-1515, 2010. DOI 10.1098/rstb.2009.0124. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0124>. Acesso em: 11 jul. 2024.

SILVA, L. K. X. *et al.* Testicular thermoregulation, scrotal surface temperature patterns and semen quality of water buffalo bulls reared in a tropical climate. **Andrologia**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. e12836, 2018. DOI 10.1111/and.12836. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/and.12836>. Acesso em: 2 maio 2025.

SOERENSEN, D. D. *et al.* Determining the emissivity of pig skin for accurate infrared thermography. **Computers and Electronics in Agriculture**, [s. l.], v. 109, p. 52-58, 2014. DOI 10.1016/j.compag.2014.09.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2014.09.003>. Acesso em: 19 fev. 2025.

SONG, Y. *et al.* The mechanism of heat stress resistance during spermatogenesis in Turpan black sheep. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 9, p. 846981, 2022. DOI 10.3389/fvets.2022.846981. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.846981>. Acesso em: 25 ago. 2024.

SOUSA, P. C. *et al.* Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 924-930, 2013. DOI 10.1590/S0100-736X2013000700014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000700014>. Acesso em: 13 jun. 2025.

SOUZA, C. E. A. *et al.* Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 75, n. 14, p. 4436-4456, 2012. DOI 10.1016/j.jprot.2012.05.039. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.039>. Acesso em: 4 dez. 2024.

STEWART, M. *et al.* Non-invasive measurement of stress in dairy cows using infrared thermography. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 520-525, 2007. DOI 10.1016/j.physbeh.2007.04.034. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.034>. Acesso em: 30 jan. 2026.

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**, [s. l.], v. 243, p. 107443, 2025. DOI 10.1016/j.smallrumres.2025.107443. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2025.107443>. Acesso em: 8 jan. 2026.

TORT, L.; TELES, M. The endocrine response to stress: a comparative view. In: AKIN, Fulya (ed.). **Basic and Clinical Endocrinology Up-to-Date**. Rijeka: InTech, 2011. p. 263-286. DOI 10.5772/21446. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/21446>. Acesso em: 19 maio 2024.

TUFONI, C. *et al.* Flagellar beating forces of human spermatozoa with different motility behaviors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 28, 2024. DOI 10.1186/s12958-024-01197-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12958-024-01197-8>. Acesso em: 27 ago. 2024.

VIANA NETO, A. M. *et al.* Sperm traits and seminal plasma proteome of locally adapted hairy rams subjected to intermittent scrotal insulation. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 263, p. 107439, 2024. DOI 10.1016/j.anireprosci.2024.107439. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107439>. Acesso em: 12 fev. 2025.

VIEIRA NETO, M. F. *et al.* Testicular thermography and seminal quality in bucks submitted to intermittent scrotal insulation in tropical climate. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 721-734, 2021. DOI 10.5433/1679-0359.2021v42n2p721. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n2p721>. Acesso em: 4 nov. 2025.

WALLAGE, A. L. *et al.* Thermoregulation of the bovine scrotum 2: simulated acute and chronic heat waves reduces the scrotal thermoregulatory capability of Wagyu bulls. **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 251-262, 2022. DOI 10.1007/s00484-021-02108-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00484-021-02108-x>. Acesso em: 18 mar. 2024.

WANG, X. *et al.* A review and quantitative assessment of cattle-related thermal indices. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 77, p. 24-37, 2018. DOI 10.1016/j.jtherbio.2018.08.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.005>. Acesso em: 7 ago. 2024.

WEN, F. *et al.* ROS-DRP1-mediated excessive mitochondrial fission and autophagic flux inhibition contribute to heat stress-induced apoptosis in goat Sertoli cells. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 58, 2025. DOI 10.1186/s40104-025-01180-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40104-025-01180-2>. Acesso em: 20 maio 2025.

YANG, W. R.; LI, B. B.; HU, Y.; ZHANG, L.; WANG, X. Z. Oxidative stress mediates heat-induced changes of tight junction proteins in porcine Sertoli cells via inhibiting CaMKK β -AMPK pathway. **Theriogenology**, [s. l.], v. 142, p. 104-113, 2020. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.09.031. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.031>. Acesso em: 12 nov. 2024.

ZHANG, P. *et al.* Melatonin protects the mouse testis against heat-induced damage. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 65-79, 2020. DOI 10.1093/molehr/gaaa002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa002>. Acesso em: 23 jan. 2025.