



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES DA
FERTILIDADE EM MODELOS ANIMAIS: PERFIL METABOLÔMICO DO
PLASMA SEMINAL EM TOUROS E EXPRESSÃO DA INTEGRINA SUBUNIDADE
BETA 5 NO ESPERMATOZOIDE, OÓCITO E EMBRIÃO BOVINO**

ANA LUIZA MALHADO CAZAUX DE SOUZA VELHO

FORTALEZA

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES DA
FERTILIDADE EM MODELOS ANIMAIS: PERFIL METABOLÔMICO DO
PLASMA SEMINAL EM TOUROS E EXPRESSÃO DA INTEGRINA SUBUNIDADE
BETA 5 NO ESPERMATOZOIDE, OÓCITO E EMBRIÃO BOVINO**

ANA LUIZA MALHADO CAZAUX DE SOUZA VELHO

FORTALEZA

2017

ANA LUIZA MALHADO CAZAUX DE SOUZA VELHO

**ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DE MARCADORES
MOLECULARES DA FERTILIDADE EM MODELOS ANIMAIS:
PERFIL METABOLÔMICO DO PLASMA SEMINAL EM TOUROS E
EXPRESSÃO DA INTEGRINA SUBUNIDADE BETA 5 NO
ESPERMATOZOIDE, OÓCITO E EMBRIÃO BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

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

Co-orientadora: Dra. Erika da Silva Bezerra de Menezes

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V545e Velho, Ana Luiza Malhado Cazaux de Souza.
Estratégias para o estudo de marcadores moleculares da fertilidade em modelos animais: perfil metabolômico do plasma seminal em touros e expressão da integrina subunidade beta 5 no espermatozoide, oócito e embrião bovino. / Ana Luiza Malhado Cazaux de Souza Velho. – 2017.
114 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2017.

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

Coorientação: Profa. Dra. Erika da Silva Bezerra de Menezes.

1. Fluido seminal. 2. Gametas. 3. Metabólitos. 4. Metaboloma. 5. Biomarcadores. I. Título.

CDD 636.08

ANA LUIZA MALHADO CAZAUX DE SOUZA VELHO

**ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DE MARCADORES
MOLECULARES DA FERTILIDADE EM MODELOS ANIMAIS:
PERFIL METABOLÔMICO DO PLASMA SEMINAL EM TOUROS E
EXPRESSÃO DA INTEGRINA SUBUNIDADE BETA 5 NO
ESPERMATOZOIDE, OÓCITO E EMBRIÃO BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

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

Profa. Dra. Lucia Daniel da Silva
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

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

Profa. Dra. Claudia do O Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Mesmo que a vida pareça difícil, há sempre algo que você pode fazer para ter sucesso nela. ”

(Stephen Hawking)

Aos meus pais, Vanira e Alberto, meus alicerces, que me ensinaram a sempre lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, o Mestre e Criador supremo, que é a minha “força” real, por estar continuamente abençoando a minha vida, estando sempre presente na minha caminhada e guiando-me com Sua luz divina, principalmente nos momentos de maior fragilidade.

Aos meus pais Vanira e Alberto, por todo amor incondicional, pelo apoio imensurável em todas as minhas decisões, pelo estímulo e pelos conselhos e por sempre permanecerem ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Sem eles eu não teria conseguido esta conquista. Agradeço a Deus por vocês existirem em minha vida!

Aos meus avós, Luiza e Carlos, por todos os ensinamentos de união, perseverança e força e por ensinarem que posso lutar pelos meus sonhos. Agradeço pela oportunidade de estarem mais próximos durante este ano e por proporcionarem momentos inesquecíveis de felicidade junto a nossa família.

Ao meu irmão Felipe e à minha prima-irmã Mariana, pelo exemplo de superação e força, por todo o amor, fraternidade, carinho e por sempre me incentivarem e acreditarem na minha capacidade e sucesso.

Ao Iran, por sempre torcer pelo meu sucesso e me estimular durante esta importante etapa da minha vida, mesmo nos momentos em que estivemos distantes fisicamente. Agradeço, também, pelo seu companheirismo, amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arlindo Moura, pela confiança e por sempre tentar extrair o meu máximo, através da sua ajuda e dos seus ensinamentos serei uma profissional mais confiante, tentando sempre buscar um maior conhecimento. Agradeço igualmente pelas orientações, conselhos e pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduiche.

Ao Dr. Erdogan Memili, pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduiche na *Mississippi State University*, Estados Unidos, e por toda orientação durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Dr. Thu Dinh, por toda ajuda, paciência e conhecimentos transmitidos durante o período em que eu estive realizando o Doutorado Sanduíche no *Department of Animal and Dairy Sciences* da *Mississippi State University*.

Aos meus grandes amigos Fagner e Solange, pela amizade que só aumentou durante estes anos de doutorado, pelos momentos de alegria compartilhados e por sempre se disponibilizarem a ajudar.

À minha querida amiga Érika, pela sua co-orientação durante o desenvolvimento do presente trabalho e por estar comigo em todos os momentos desta importante etapa da minha vida, por sempre me escutar e me estimular e pela sua imensa amizade.

À Júlia, por toda ajuda, amizade, incentivo e pelas risadas. Agradeço, também, pelos conhecimentos compartilhados durante as coletas de amostras humanas nos centros cirúrgicos, uma experiência maravilhosa e totalmente nova para nós duas.

À equipe do laboratório em Biologia da Reprodução Animal – UFC, Rodrigo, Jorge, Paula, Maurício, Aderson, Revila, Taciane, Bruna, Kamila, Arabela, Monica, Deyse, Mayra, Mariana, Moemia, Renato e Nielyson, pelos dias de muito trabalho, alegria e convívio.

Às minhas maravilhosas amigas Ana Cícera, Fernanda e Thais, anjos que Deus colocou em minha vida, por sempre estarem ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, pelos conselhos, imensurável amizade e por continuamente torcerem pelo meu sucesso

Aos meus amigos Dafne e Jeremy, pelo acolhimento em *Starkville*, Estados Unidos, pela amizade construída e por todo o apoio.

Aos meus amigos Fábio, Ericmar e Katai, por todos os momentos maravilhosos que dividimos juntos em *Starkville* e por se tornarem amigos muito especiais.

À Universidade Federal do Ceará e à *Mississippi State University*, pela oportunidade de cursar o doutorado e realizar o doutorado sanduiche.

Aos professores do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, por todo conhecimento transmitido.

À banca examinadora, pelas valiosas correções e sugestões.

À instituição financiadora CAPES, pelas bolsas concedidas durante o desenvolvimento do trabalho.

À instituição financiadora CNPq, pelo financiamento concedido para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	24
2 CAPÍTULO I - APLICAÇÕES DA METABOLÔMICA NA BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO	26
2.1 INTRODUÇÃO.....	29
2.2 METABOLÔMICA E O ESTUDO DA REPRODUÇÃO	31
<i>2.2.1 Utilização da metabolômica nas tecnologias de reprodução assistida e no estudo da reprodução feminina</i>	35
<i>2.2.2 Aplicação da abordagem metabolômica no estudo da reprodução masculina</i>	36
<i>2.2.3 Outros empregos da metabolômica na biologia reprodutiva</i>	37
2.3 ANIMAIS DE PRODUÇÃO COMO MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS REPRODUTIVOS EM SERES HUMANOS UTILIZANDO A ABORDAGEM METABOLÔMICA	38
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40
3 CAPÍTULO II - MARCADORES METABÓLICOS DE FERTILIDADE NO PLASMA SEMINAL DE TOUROS	45
3.1 INTRODUÇÃO.....	48
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
<i>3.2.1 Desenho experimental</i>	49
<i>3.2.2 Coleta das amostras e determinação da fertilidade dos touros</i>	50
<i>3.2.3 Preparação das amostras para as análises de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM)</i>	51
<i>3.2.4 Análises de CG-EM</i>	52
<i>3.2.5 Análise estatística</i>	53
<i>3.2.6 Análise in silico das redes metabólicas</i>	54
3.3 RESULTADOS	54
<i>3.3.1 Metaboloma do plasma seminal de touros</i>	54

3.3.2 Classe química dos metabólitos	63
3.3.3 Metabólitos mais e menos predominantes do plasma seminal de touros	64
3.3.4 Associações entre os metabólitos do plasma seminal e a fertilidade dos touros	65
3.3.5 Redes metabólicas dos metabólitos do plasma seminal de touros	69
3.4 DISCUSSÃO	71
3.5 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76
4 CAPÍTULO III - CONSERVAÇÃO EVOLUTIVA E DINÂMICA DE EXPRESSÃO DA INTEGRINA SUBUNIDADE BETA 5 EM GAMETAS E EMBRIÕES BOVINOS	84
4.1 INTRODUÇÃO.....	87
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4.2.1 Determinação da fertilidade dos touros	88
4.2.2 Determinação dos níveis de expressão da ITGβ5 em espermatozoides de touros.....	89
4.2.2.1 Extração e quantificação de proteínas espermáticas.....	89
4.2.2.2 Análises por western blotting da ITGβ5 nos espermatozoides de touros	90
4.2.3 PCR em tempo real para determinar os níveis de transcritos da ITGβ5 em oócitos e embriões bovinos.....	91
4.2.3.1 Primers	91
4.2.3.2 Extração, quantificação e purificação do RNA e síntese do cDNA	92
4.2.3.3 Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	92
4.2.4 Análise estatística	93
4.2.5 Análises de bioinformática da proteína ITGβ5	93
4.2.5.1 Alinhamento de sequências múltiplas de aminoácidos e avaliação da percentagem de identidade da proteína ITGβ5 de bovino em comparação com outras espécies.....	93
4.2.5.2 Análise de dottup de similaridade das sequências de aminoácidos da ITGβ5 entre bovino, humano e camundongo	94

4.2.5.3 <i>Árvore filogenética da ITGβ5</i>	94
4.2.5.4 <i>Domínios conservados da ITGβ5</i>	94
4.3 RESULTADOS	95
4.3.1 <i>Deteção da proteína ITGβ5 nos espermatozoides de touros</i>	95
4.3.2 <i>Expressão de transcritos da ITGβ5 em oócitos e embriões bovinos</i>	96
4.3.3 <i>Conservação evolutiva da ITGβ5</i>	96
4.4 DISCUSSÃO	100
4.5 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES	106

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I

Tabela 1. Principais abordagens metabolômicas em reprodução.....	33
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Fertilidade dos dezesseis touros. Os touros de 1 a 8 foram definidos como animais de alta fertilidade (AF) e os touros de 9 a 16 foram agrupados como baixa fertilidade (BF). A fertilidade de cada touro foi expressa como a percentagem de desvio da taxa de concepção de cada touro em relação à média de todos os touros. O software <i>Probit.F90</i> foi usado para estimar a fertilidade.....	54
---	----

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos.....	58
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Dados de fertilidade dos touros. O escore de fertilidade de cada touro foi obtido usando o software <i>Probit.F90</i> e expresso como a percentagem de desvio das suas taxas de concepção em relação à média de concepção de todos os touros.....	95
--	----

Tabela 2. Percentagem de identidade da sequência de aminoácidos da proteína ITGβ5 de bovino <i>versus</i> 17 espécies. As percentagens de identidade foram obtidas por meio do programa <i>Clustal Omega</i>	103
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Cromatograma representativo de CG-EM do plasma seminal de touros. Os picos do ácido láctico, glicerol, ácido fosfórico, ácido cítrico, frutose, ácido heptadecanóico (padrão interno) e colesterol são apresentados..... 65
- Figura 2.** Número de metabólitos por classe química. Os metabólitos identificados foram categorizados de acordo com suas classes químicas, definidas como aminoácidos, peptídeos e análogos; carboidratos e seus conjugados; ácidos graxos e seus conjugados; esteroides e derivados; nucleosídeos, nucleotídeos e análogos; outros compostos orgânicos e compostos inorgânicos..... 66
- Figura 3.** Razões de abundância dos metabólitos mais (A) e menos (B) abundantes identificados no plasma seminal de touros. A razão de abundância dos metabólitos foi calculada por meio da divisão das abundâncias dos íons alvo de cada metabólito pela abundância do padrão interno. As barras verticais representam o erro padrão da média..... 67
- Figura 4.** Gráfico das pontuações de PLS-DA do plasma seminal de touros de alta (Δ AF) e baixa (+ BF) fertilidade..... 68
- Figura 5.** Escores de VIP dos metabólitos do plasma seminal de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF). Os metabólitos com $VIP > 1,5$ foram selecionados. O mapa de calor (*heatmap*) com os quadrados vermelhos e verdes indica a concentração alta ou baixa, respectivamente, do metabólito correspondente nos touros de AF e BF. A pontuação VIP foi baseada no modelo PLS-DA..... 69
- Figura 6.** Gráficos de *box plot* das razões de abundância dos metabólitos ácido 2-oxoglutárico (A), frutose (B), ornitina (C), L-leucina (D) e D-manitol (E), identificados no plasma seminal de touros e que foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os touros de alta (AF) e baixa (BF) fertilidade. 70

Figura 7. Mapa de calor da correlação de *Pearson* entre os metabólitos identificados no plasma seminal de touros. O mapa de calor (*heatmap*) com os quadrados vermelho escuro e azul escuro indica uma alta correlação positiva e uma alta correlação negativa, respectivamente, entre os metabólitos identificados..... 71

Figura 8. Redes metabólicas dos metabólitos frutose (A), ácido cítrico (B), ácido láctico (C), ureia (D) e ácido 2-oxoglutárico (E), identificados no plasma seminal de touros: As redes metabólicas foram geradas usando o *Metscape*, versão 3.1.2, um *plug-in* do programa *Cytoscape*, versão 3.2.1 (<http://www.cytoscape.org>). Os metabólitos inseridos no programa são mostrados em hexágonos vermelhos. Os compostos gerados pelo programa são representados como hexágonos cor-de-rosa, as reações reversíveis, como quadrados cinza com texto roxo e, as reações não reversíveis, como quadrados cinza com texto laranja..... 73

CAPÍTULO III

Figura 1. Níveis de expressão da proteína ITG β 5 na membrana plasmática das células espermáticas de touros. (A) Análise de western blotting da proteína ITG β 5 nos espermatozoides de touros (1-8) com diferentes escores de fertilidade. (B) Intensidades das bandas da proteína ITG β 5 nos espermatozoides de touros (1-8). MW: peso molecular..... 101

Figura 2. Número de transcritos de ITG β 5 em oócitos, embriões de 2 células, embriões de 8 a 16 células, mórulas e blastocistos bovinos. A análise por RT-qPCR foi realizada para avaliar a abundância de transcritos da ITG β 5. Os transcritos nos oócitos e embriões bovinos foram analisados estatisticamente utilizando uma análise de variância. Letras diferentes correspondem às diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as amostras analisadas..... 102

Figura 3. Semelhanças das sequências de aminoácidos da proteína ITG β 5 entre bovino, humano e camundongo. A análise de *dottup* foi realizada para comparar a similaridade das sequências de aminoácidos da proteína ITG β 5 entre as espécies. Uma

linha diagonal contínua indica semelhança entre as sequências e a ruptura da linha indica baixa similaridade. O tamanho da janela utilizada foi de 10..... 104

Figura 4. Árvore filogenética da proteína ITGB5. A análise de comparação evolutiva da proteína ITGB5 entre as espécies de animais foi realizada pelo programa MEGA 6 e envolveu 17 sequências de aminoácidos..... 105

Figura 5. Domínios conservados da proteína ITG β 5. Os domínios da ITG β 5 são a superfamília do fator de Von Willebrand tipo A (vWFA), integrina beta cauda e domínio citoplasmático beta da integrina..... 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AF	Alta Fertilidade
ANKH	Proteína de Anquilose Progressiva
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
BF	Baixa Fertilidade
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
BSTFA	<i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>
Ca²⁺	Cálcio
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
cDNA	DNA complementar
CG-EM	Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massas
CL-EM	Cromatografia Líquida Associada à Espectrometria de Massa
ddH₂O	Água bidestilada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DEPC	Dietil Pirocarbonato
EIVTF	Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier
EM	Espectrometria de Massas
eV	Elétron-volt
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
G	Constante gravitacional
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>

iPOP	<i>Integrative Personal Omics Profile</i>
ITGβ5	Integrina Subunidade Beta 5
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto
m/z	Razão massa/carga
mg	Miligrama
min	Minuto
MSU	<i>Mississippi State University</i>
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Micromolar
NIR	Espectrometria de Infravermelho Próximo
PBS-T	Tampão Fosfato Salino com 0,1% de Tween 20
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
PPA	Pirofosfatase Inorgânica
PPi	Pirofosfato Inorgânico
PRNP	Proteína priônica
PVDF	Polyvinylidene difluoride
REST	Ferramenta do Software de Expressão Relativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RT-qPCR	Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
seg	Segundo
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
T_m	Temperatura de fusão
TMCS	Trimethylchlorosilane
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TUBβ2C	Tubulina Beta 2C

uma	Unidade de Massa Atômica
UV	Ultravioleta
V	Volt
VCAM-1	Molécula de Adesão de Células Vasculares 1
VIP	Importância da Variável na Projeção
vWFA	Fator de Von Willebrand tipo A
α	Alfa
β	Beta

**ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES DA
FERTILIDADE EM MODELOS ANIMAIS: PERFIL METABOLÔMICO DO
PLASMA SEMINAL EM TOUROS E EXPRESSÃO DA INTEGRINA SUBUNIDADE
BETA 5 NO ESPERMATOZOIDE, OÓCITO E EMBRIÃO BOVINO.**

RESUMO GERAL - Os metabólitos e as proteínas, incluindo as integrinas, são importantes na fisiologia reprodutiva de animais e seres humanos. Entretanto, ainda são desconhecidos os metabólitos do plasma seminal que estão associados com a fertilidade de touros e ainda não se sabe os possíveis papéis da integrina subunidade beta 5 (ITG β 5) na fecundação e no desenvolvimento embrionário de bovinos. Assim sendo, os objetivos do presente trabalho foram: (1) determinar o metaboloma do plasma seminal de touros com diferentes escores de fertilidades, (2) identificar metabólitos que demonstram ser potenciais marcadores de fertilidade em touros, (3) avaliar a expressão da ITG β 5 em espermatozoides, oócitos e embriões bovinos em fases iniciais de desenvolvimento e, (4) verificar a conservação evolutiva da ITG β 5 por meio de ferramentas de bioinformática. No **estudo 1** foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM) para determinar o metaboloma do plasma seminal de 16 touros com alta e baixa fertilidade. Em seguida, os dados foram submetidos a análise estatística multivariada e univariada. A partir destes resultados, análises de bioinformática foram realizadas a fim de identificar as vias metabólicas associadas com o metaboloma do plasma seminal desses touros. Sessenta e três metabólitos foram identificados no plasma seminal de touros com diferentes escores de fertilidade. A frutose foi detectada como o metabólito mais abundante, seguido pelo ácido cítrico, ácido láctico, ureia e ácido fosfórico. Já androstenediona, 4-cetoglicose, D-xilofuranose, ácido 2-oxoglutárico e o ácido eritrônico foram os metabólitos menos abundantes do fluído seminal de touros. A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) revelou uma separação distinta entre os touros de alta e de baixa fertilidade. Os metabólitos com as maiores pontuações de Importância da Variável na Projeção (VIP > 2) foram o ácido 2-oxoglutárico e a frutose. A análise do mapa de calor (*heatmap*), com base na pontuação de VIP, e as análises univariadas indicaram que o ácido 2-oxoglutárico foi significativamente menor ($P = 0,02$) e a frutose foi significativamente maior ($P = 0,02$) em touros de alta fertilidade comparados aos touros de baixa fertilidade. O presente estudo foi o primeiro a identificar o perfil metabolômico do plasma seminal de touros empregando a CG-EM e o primeiro a mostrar o ácido 2-oxoglutárico e a frutose como potenciais biomarcadores de fertilidade em touros. No **estudo 2**, os níveis de expressão da

proteína ITG β 5 em espermatozoide de touros foi avaliada pela técnica de western blotting. A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi empregada para avaliar os níveis de expressão de transcritos da ITG β 5 em oócitos e embriões bovinos. Além disso, ferramentas de bioinformática foram utilizadas com o intuito de determinar a conservação evolutiva da proteína ITG β 5 entre várias espécies. Os resultados do western blotting confirmaram a presença da proteína ITG β 5 em espermatozoides de touros e, com base nas análises de RT-qPCR, foi observado que a ITG β 5 está presente nos oócitos e que os níveis dela são significativamente mais elevados nos embriões bovinos de 2 células, seguidos pelos embriões de 8-16 células. As análises de bioinformática mostraram que a ITG β 5 é conservada em várias espécies. Desta forma, nossos resultados demonstram a presença da ITG β 5 em espermatozoides, bem como em oócitos e embriões bovinos em estágios iniciais se desenvolvimento, sugerindo um importante papel da ITG β 5 na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial desta espécie.

Palavras-chave: fluido seminal, gametas, metabólitos, metaboloma, biomarcadores, ITG β 5.

**STRATEGIES FOR THE STUDY OF MOLECULAR MARKERS OF FERTILITY IN
ANIMAL MODELS: METABOLOMIC PROFILE OF SEMINAL PLASMA IN
BULLS AND EXPRESSION OF INTEGRINA BETA SUBUNIT 5 IN BOVINE
SPERM, OOCYTE AND EMBRYO.**

ABSTRACT - Metabolites and proteins including integrins are important in the reproductive physiology of animals and humans. However, seminal plasma metabolites that are associated with bull fertility are still unknown and the possible roles of the integrin subunit beta 5 (ITG β 5) in fertilization and embryonic development of bovine are not yet known. Therefore, the objectives of the present study were (1) to determine comprehensive metabolome of seminal plasma from Holstein bulls with differing fertility scores, and (2) to ascertain potential metabolites as biomarkers associated with bull fertility, (3) to evaluate expression of ITG β 5 in sperm, oocytes and early bovine embryos, and (4) to ascertain the evolutionary conservation of ITG β 5. In the **study 1**, chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed to determine seminal plasma metabolome from 16 Holstein bulls with two fertility scores. Soon after, data were evaluated using multivariate and univariate analyses. Bioinformatics analyzes were performed in order to identify metabolic pathways associated with bull's seminal plasma metabolites. Our results showed that 63 metabolites were identified in bull seminal plasma. Fructose was the most abundant metabolite detected followed by citric acid, lactic acid, urea, and phosphoric acid. Androstenedione, 4-ketoglucose, D-xylofuranose, 2-oxoglutaric acid and erythronic acid were the least predominant metabolites found in bull's seminal fluid. PLS-DA showed a distinct separation between high and low fertility bulls as regard to scores plot. Metabolites with the greatest VIP score (VIP > 2) were 2-oxoglutaric acid and fructose. Heat-map analysis based on VIP score and univariate analysis indicated that 2-oxoglutaric acid was less ($P = 0.02$) and fructose was significantly greater ($P = 0.02$) in high-fertility bulls as compared to low-fertility bulls. To the best of our knowledge the current study is the first to identify the comprehensive metabolomic profiling of bull seminal plasma with differing fertility score and to present the potential of metabolites such as 2-oxoglutaric acid and fructose as biomarkers of bull fertility using GC-MS. In the **study 2**, expression levels of ITG β 5 protein in bull sperm were evaluated by western blotting. Real time-qPCR was carried out to evaluate the expression levels of ITG β 5 transcripts in oocytes and embryos from bovine species. In addition, bioinformatic tools were performed to determine to evolutionary conservation of ITG β 5 across species. Western blotting results showed the presence of ITG β 5 on bull spermatozoa. Moreover,

RT-qPCR results demonstrated that ITG β 5 is present in bovine oocytes and that ITG β 5 levels were significantly higher in 2-cell embryos and 8-16 cell embryos. Bioinformatics analyses showed that ITG β 5 is conserved across species. Therefore, our results showed the presence of ITG β 5 in spermatozoa as well as oocytes and embryos in early stages of development, suggesting an important role of ITG β 5 upon fecundation and early embryo development in the bovine species.

Key-words: seminal fluid, gametes, metabolites, metabolome, biomarkers, ITG β 5.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A fusão dos gametas masculino e feminino é um dos eventos mais importantes para um desenvolvimento embrionário bem-sucedido. A interação do espermatozoide à zona pelúcida desencadeia a reação acrossômica e, logo em seguida, o espermatozoide adquire a capacidade de penetrar oócito, promovendo o início da embriogênese. Sendo assim, as biotecnologias reprodutivas utilizando embriões bovinos são importantes para a pecuária mundial, pois essas avançadas tecnologias permitem a produção de descendentes com maior mérito genético. A ocorrência de anormalidades durante os eventos de pré- e pós-implantação e/ou de defeitos moleculares em espermatozoides ou oócitos desencadeiam falhas no momento da fertilização e/ou durante o desenvolvimento embrionário inicial. Desta forma, existe a necessidade de determinação dos aspectos moleculares associados à capacidade fecundante do espermatozoide, à qualidade do oócito e, conseqüentemente, às fases de fecundação e desenvolvimento embrionário.

A fertilidade do touro é uma das características que pode afetar os estágios dos distintos processos reprodutivos, e tem sido definida como a aptidão do animal de produzir espermatozoides capazes de fertilizar, ativar o oócito e, posteriormente, sustentar o desenvolvimento embrionário, produzindo uma descendência viva. Assim sendo, estudos sobre os índices de fertilidade são essenciais para a reprodução animal, pois o sêmen de um único reprodutor pode ser utilizado para inseminar inúmeras vacas. Atualmente, existem muitos métodos de rotina empregados a campo e em laboratório com o intuito de prever a fertilidade dos animais. Dentre os principais métodos utilizados destacam-se o exame andrológico e a avaliação do sêmen. Apesar de úteis, os resultados obtidos por essas análises de rotina demonstram uma correlação limitada com a fertilidade dos animais. Além disso, sabe-se que alguns fatores como genéticos e epigenéticos, que regulam a qualidade seminal de touros e, assim, a fertilidade, são difíceis de serem detectados nos testes de rotina. Por esse motivo, nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de descobrir potenciais biomarcadores de fertilidade no sêmen de animais de produção.

Um biomarcador ou marcador biológico é uma característica ou indicador quantificável e/ou mensurável, o qual representa um fenótipo funcional ou uma determinada patologia de um organismo vivo. Desta forma, diversos estudos empregando as abordagens “ômicas”, incluindo a genômica, a transcriptômica e a proteômica, têm demonstrado que inúmeras moléculas, tais

como: DNA, RNA e proteínas, presentes no plasma seminal, bem como, nos espermatozoides, podem ser potenciais biomarcadores de fertilidade masculina. Entre as proteínas identificadas e associadas a fertilidade de touros, estão as integrinas, as quais os estudos têm mostrado que podem participar de importantes etapas como a adesão, fusão do espermatozoide ao oócito e, conseqüentemente, durante o processo de fecundação. As integrinas são glicoproteínas transmembranares de adesão e mediam a ligação celular à matriz extracelular e as interações célula-célula. Essas proteínas são formadas por heterodímeros α e β , sendo que nas células de vertebrados existem 18 subunidades α diferentes, as quais são a $\alpha 1-11$, αv , αllb , αE , αL , αM , αX , αD e oito subunidades β , $\beta 1-8$. No testículo e no fluido do epidídimo humano, a integrina subunidade beta 5 (ITG $\beta 5$) já foi identificada e estudos mostraram evidências de que essa molécula está associada à fertilidade de touros.

Recentemente, estudos têm sido conduzidos empregando outra análise “ômica”, a metabolômica. Esta abordagem consiste na identificação de todos os metabólitos (aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, nucleotídeos, entre outros), presentes em um fluido, célula, tecido, órgão e/ou organismo. A metabolômica vem sendo utilizada, pois esta técnica permite que se tenha uma maior compreensão do fenótipo, revelando mais informações sobre mudanças nas reações metabólicas que ocorrem no organismo e possibilitando, assim, a identificação de potenciais biomarcadores. Na biologia da reprodução, a metabolômica vem sendo empregada em tecnologias de reprodução assistida e em estudos para identificar biomarcadores de fertilidade feminina e masculina.

Apesar dos avanços obtidos com o uso das abordagens “ômicas” na fisiologia reprodutiva, ainda não se conhece a identidade de metabólitos específicos presentes no plasma seminal e que influenciam a fertilidade de touros, bem como, estudos que identificam os metabólitos e os associam aos processos fisiológicos envolvendo a reprodução masculina e a fertilização ainda são escassos. Além disso, pesquisas sobre as possíveis funções da ITG $\beta 5$ na ativação de oócitos e no desenvolvimento embrionário de bovinos são essenciais para elucidar os mecanismos da fisiologia da reprodução nos quais essas moléculas estão envolvidas. Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram determinar o metaboloma do plasma seminal de touros com diferentes escores de fertilidade, identificar metabólitos que se apresentam como potenciais marcadores de fertilidade em touros, avaliar a expressão da ITG $\beta 5$ em espermatozoides, oócitos e embriões bovinos em fases iniciais de desenvolvimento e, verificar a conservação evolutiva da ITG $\beta 5$.

2 CAPÍTULO I

APLICAÇÕES DA METABOLÔMICA NA BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

Applications of metabolomics in reproductive biology

Referencial teórico

(Capítulo publicado no livro: *Animal models and human reproduction*. ed.Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons Inc, 2016, p. 509-518.

Velho ALC; Oliveira R; Dinh, T.; Moura A; Kaya A; Memili E)

Aplicações da metabolômica na biologia da reprodução

RESUMO

A metabolômica é o estudo de metabólitos como biomarcadores que representam um fenótipo em uma célula, tecido, organismo e/ou fluido. As redes de metabólitos são complexas e altamente interconectadas e, por isso, a metabolômica têm se mostrado uma abordagem poderosa para as pesquisas envolvendo a fisiopatologia da reprodução. Neste contexto, nos últimos anos, os estudos utilizando as abordagens metabolômicas quantitativas têm avançado e essas análises têm sido, também, utilizadas para o diagnóstico não-invasivo de patologias reprodutivas. Além disso, o advento de alguns desses novos métodos em biologia molecular estimulou, bem como, permitiu o progresso em pesquisas que objetivam identificar biomarcadores de fertilidade feminina e masculina. Embora, até o momento, os estudos utilizando análises metabolômicas na área de reprodução animal ainda sejam escassos, os resultados obtidos revelaram-se positivos. Deste modo, os objetivos desta presente revisão são mostrar a utilização da metabolômica na fisiopatologia da reprodução e apresentar o emprego desta análise em estudos utilizando animais de produção como modelos experimentais para pesquisas de reprodução humana.

Palavras-chave: perfil metabolômico, pequenas moléculas, metabólitos, metaboloma, reprodução.

Applications of metabolomics in reproductive biology

ABSTRACT

Metabolomics is the study of metabolites as biomarkers that represent a phenotype in a cell, tissue, organism and/or fluid. The metabolites pathways are complex and highly interconnected. Therefore, metabolomics has been shown to be a powerful approach for research involving the pathophysiology of reproduction. In this context, in recent years, studies using quantitative metabolomics approaches have advanced and these analyzes have also been used for the noninvasive diagnosis of reproductive pathologies. In addition, the advent of some of these new methods in molecular biology stimulated as well as allowed progress in researches that aimed to identify biomarkers of female and male fertility. Although, studies using metabolomics analysis in the animal reproduction field are still scarce, the results obtained were positive. Thus, the objectives of this review are to present the use of the metabolomics approach in studies of the reproduction pathophysiology and demonstrate the promising use of this methodology in experiments involving production animals as experimental models for the study of human reproduction.

Keywords: metabolic profiling, small molecules, metabolites, metabolome, reproduction.

2.1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos são pequenas moléculas associadas aos produtos de reações metabólicas que participam de diversas vias bioquímicas (DUNN et al., 2011). Essas moléculas desempenham um papel essencial em processos biológicos e têm sido associadas como potenciais biomarcadores, os quais auxiliam a prever e/ou detectar estágios de desenvolvimento, eventos fisiológicos, doenças ou fenótipos específicos. A fim de avaliar metabólitos endógenos, vários grupos de pesquisa têm como objetivo compreender as redes metabólicas por meio da abordagem metabolômica. Esta metodologia permite a identificação e quantificação de pequenas moléculas, tais como: aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, entre outras, em diferentes grupos celulares, tecidos, fluidos, órgãos e organismos (OLIVER et al., 1998; FIEHN, 2001, 2002; DUNN et al., 2005). Embora o termo “metaboloma” tenha sido introduzido em 1998 por Oliver et al. (1998), os estudos empregando esta abordagem começaram a serem realizados entre 1960 e 1970. Como exemplo, destaca-se a pesquisa desenvolvida por Pauling et al. (1971), na qual os autores empregaram a técnica de cromatografia líquida para separar e quantificar moléculas na urina humana.

Nos últimos anos, um avanço significativo tem sido observado em estudos empregando diversas estratégias metodológicas relacionadas à metabolômica, incluindo a metabonômica, impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*), análise de metabólitos alvos (*metabolite targeting*) e o perfil metabólico (*metabolic profiling*). Assim sendo, a metabonômica é usada para mensurar as diferenças nos níveis de metabólitos resultantes de patologias, modificações genéticas e alterações causadas por toxinas e/ou pelo uso de drogas. Já a impressão digital metabólica é um método rápido para avaliar e classificar amostras biológicas ou biópsias. A análise de metabólitos alvos, por sua vez, é usada para identificar vias metabólicas específicas de um número limitado de metabólitos. Já o perfil metabólico é utilizado para avaliar um grupo de metabólitos, os quais participam de uma via metabólica específica (DUNN; ELLIS, 2005; HOLLYWOOD et al., 2006; HOLMES et al., 2008; DUNN et al., 2011; PATTI et al., 2012).

A abordagem metabolômica pode ser realizada em associação a outros métodos “ômicos”, incluindo a genômica, transcriptômica e proteômica, como demonstrado em um interessante estudo empregando o método “*Integrative Personal Omics Profile*” (iPOP). Esse método foi utilizado para identificar marcadores moleculares de possíveis doenças. Nesta pesquisa, os autores sugeriram que o uso desta metodologia, a qual associa diferentes abordagens “ômicas”, pode facilitar a prevenção, bem como, auxiliar no diagnóstico precoce

de determinadas doenças, tais como: a diabetes mellitus tipo 2, anemia aplástica, infecção pelo rinovírus humano e infecção pelo vírus sincicial respiratório (CHEN et al., 2012).

Embora a metabolômica ainda seja uma abordagem considerada complementar as outras análises "*ômicas*", esse método tem sido promissor, pois permite identificar e quantificar os produtos do metabolismo associados ao estado fisiológico de um indivíduo, bem como, à diferentes patologias. Neste contexto, a identificação de possíveis biomarcadores associados aos processos fisiológicos ou às alterações patológicas ocorridas em um organismo (FIEHN, 2001, 2002; GOODACRE et al., 2004; DUNN et al., 2005; HOLLYWOOD et al., 2006; PATTI et al., 2012), pode auxiliar nas pesquisas básicas relacionadas a fisiopatologia da reprodução em animais e seres humanos. Sendo assim, os objetivos desta revisão são apresentar o emprego da abordagem metabolômica em estudos da fisiopatologia da reprodução e demonstrar o uso promissor desta metodologia em experimentos envolvendo animais de produção como modelos experimentais para o estudo da reprodução humana.

2.2 METABOLÔMICA E O ESTUDO DA REPRODUÇÃO

Em associação com outros estudos inovadores, métodos mais avançados e sensíveis são vitais para abordar questões importantes na área da biologia e biotecnologia, incluindo as relacionadas com tecnologias de reprodução assistida. Um exemplo dessa aplicação, é que usando técnicas proteômicas, os pesquisadores têm mostrado que as proteínas presentes no plasma seminal melhoram a capacidade fecundante dos espermatozoides e podem auxiliar o desenvolvimento embrionário inicial na espécie bovina (MOURA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2007; MOURA et al., 2007; MONACO et al., 2009). Sabe-se, também, que os metabólitos e suas funções em vias e eventos fisiológicos específicos, entre eles a fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário, são essenciais para o sucesso reprodutivo. Assim sendo, nos últimos anos, algumas técnicas metabolômicas têm sido utilizadas em estudos de biologia reprodutiva. Entre esses métodos, pode-se destacar a espectrometria de massas (EM), geralmente associada a métodos cromatográficos, ressonância magnética nuclear (RMN), Raman, espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (EIVTF) e espectrometria de infravermelho próximo (NIR) (Tabela 1) (SINGH; SINCLAIR, 2007; SELI; ROBERT; et al., 2010; KOVAC et al., 2013; MUÑOZ, M et al., 2014; MUÑOZ, M. et al., 2014; PAIVA et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

Tabela 1. Principais abordagens metabolômicas em reprodução (*continua*).

Abordagem	Vantagens	Limitações	Aplicações e estudos na reprodução
Espectrometria de massas (EM)	Alta sensibilidade;	Requer uma grande preparação de amostras, o que pode resultar em perda de metabólitos;	Perfil metabolômico do plasma sanguíneo de mulheres com pré-eclâmpsia (KENNY et al., 2010; ODIBO et al., 2011)
	Rápida;		Impressão digital metabólica do plasma sanguíneo e da urina de mulheres com diabetes mellitus gestacional (DUDZIK et al., 2014)
	Podem ser utilizadas amostras mais complexas;	Alto custo.	Perfil metabolômico da urina de homens inférteis normozoospermicos (ZHANG; MU; et al., 2014) e oligozoospermicos (ZHANG; HUANG; et al., 2014)
	Pode ser realizada isolada ou associada a outras técnicas, como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida, as quais melhoram a identificação e quantificação dos metabólitos.		Perfil metabolômico de espermatozoides humanos (PAIVA et al., 2015)
	Perfil metabolômico do plasma sanguíneo de homens inférteis com disfunção erétil e com anormalidades seminais (ZHOU et al., 2016)		

Tabela 1. Principais abordagens metabolômicas em reprodução (*continuação*).

Abordagem	Vantagens	Limitações	Aplicações e estudos na reprodução
Ressonância magnética nuclear (RMN)			Análise de metabólitos no plasma seminal de homens com azoospermia (HAMAMAH et al., 1998)
			Perfil metabolômico do meio de cultura de embriões humanos (SELI et al., 2008)
	A preparação da amostra é simples;		Análise metabolômica da urina (DIAZ et al., 2011; MAITRE et al., 2014), do plasma sanguíneo (DIAZ et al., 2011) e do fluido amniótico de mulheres gestantes (GRACA et al., 2010)
	Analisa várias moléculas simultaneamente;	Baixa sensibilidade;	Perfil metabolômico do fluido folicular humano (WALLACE et al., 2012; O'GORMAN et al., 2013)
	Fornecer informações estruturais, as quais podem ajudar a identificar metabólitos;	Pode requerer a utilização de um grande número de amostras;	Metaboloma do fluido folicular de porcas (BERTOLDO et al., 2013)
	Alta reprodutibilidade;	Equipamento caro.	Identificação de metabólitos no plasma seminal e no soro sanguíneo associados à fertilidade de touros (KUMAR et al., 2015)
	Não é invasiva.		Perfil metabolômico de espermatozoides humanos (PAIVA et al., 2015)

Tabela 1. Principais abordagens metabolômicas em reprodução (*conclusão*).

Abordagem	Vantagens	Limitações	Aplicações e estudos na reprodução
Raman	<p>Não é necessária a preparação da amostra;</p> <p>Vários metabólitos podem ser analisados simultaneamente;</p> <p>Baixo custo;</p> <p>Mede principalmente componentes não-polares;</p> <p>Não é sensível à água, o que facilita a análise de biofluidos.</p>	<p>Não identifica metabólitos específicos;</p> <p>Pode produzir espectros de baixa intensidade.</p>	<p>Metaboloma do meio de cultura de embriões humanos (SELI et al., 2007)</p> <p>Análise metabolômica do plasma seminal de homens astenozoospermicos (GILANY et al., 2014)</p>
Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (EIVTF)	<p>Pouco preparo de amostra;</p> <p>Identifica grupos funcionais;</p> <p>Alto rendimento;</p> <p>Não é invasiva.</p>	<p>Requer desidratação de amostras;</p> <p>Fornecer informações estruturais limitadas.</p>	<p>Análise metabolômica do meio de cultura de embriões (MUÑOZ, M et al., 2014; MUÑOZ, M. et al., 2014) e do plasma sanguíneo de receptoras bovinas (MUÑOZ, M. et al., 2014)</p>
Espectrometria de infravermelho próximo (NIR)	<p>Não requer preparação da amostra;</p> <p>Não é invasiva;</p> <p>Pode analisar muitas moléculas simultaneamente;</p> <p>Rápida.</p>	<p>Sensível à água</p> <p>Não é possível identificar metabólitos específicos.</p>	<p>Metaboloma do meio de cultura de embriões humanos (SELI et al., 2007; SELI; VERGOUW; et al., 2010)</p>

2.2.1 Utilização da metabolômica nas tecnologias de reprodução assistida e no estudo da reprodução feminina

Atualmente, os métodos metabolômicos têm sido empregados como abordagens não-invasivas para melhorar as avaliações da qualidade de embriões em tecnologias de reprodução assistida (SINGH; SINCLAIR, 2007; BROMER; SELI, 2008; NAGY et al., 2008). Um exemplo desta aplicação, foi a utilização da técnica de RMN para comparar os perfis metabolômicos de meios de cultura de embriões humanos implantados e não implantados. Essas análises mostraram que os níveis de glutamato estavam associados ao potencial reprodutivo de embriões implantados, levando, assim, a gestações bem-sucedidas (SELI et al., 2008). O NIR, o Raman e o RMN, empregados como técnicas metabolômicas para analisar meios de cultura de embriões humanos, também, revelaram que estas abordagens são importantes para determinar o sucesso reprodutivo após a fecundação *in vitro* (FIV), no momento da implantação, como, também, durante a gestação (SELI et al., 2007; SELI et al., 2008; SELI; VERGOUW; et al., 2010). Pesquisas anteriores empregaram outra abordagem metabolômica, a EIVTF, para determinar o gênero de embriões bovinos (MUÑOZ, M et al., 2014; MUÑOZ, M. et al., 2014). Os autores desses estudos demonstraram que o EIVTF pode ser um outro método eficaz e não-invasivo para determinar a viabilidade embrionária. Sendo assim, o EIVTF pode ser utilizado para seleção de embriões superiores. Adicionalmente, o EIVTF foi utilizado para avaliar o metaboloma do plasma sanguíneo de vacas receptoras, com intuito de selecionar animais e obter ótimos resultados de gestação (MUÑOZ, M. et al., 2014).

Análises do perfil metabolômico de fluidos foliculares de vacas e novilhas em lactação, por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-EM), identificaram níveis mais elevados de ácidos graxos saturados no fluido de vacas quando comparado ao fluido das novilhas. Os autores desse estudo sugerem que elevados níveis de ácidos graxos no fluido folicular podem ter efeitos negativos sobre a fertilidade de vacas (BENDER et al., 2010). Em outro estudo, avaliando o metaboloma do fluido folicular de porcas por RMN, a fim de comparar a capacidade de desenvolvimento dos oócitos em relação ao tamanho dos seus folículos, foi demonstrado que os metabólitos acetato, lactato, hipoxantina, inositol, trimetilamina e aminoácidos estavam elevados no fluido folicular de pequenos folículos quando comparado ao fluido presente em folículos maiores. Em contraste, os níveis de glicose foram encontrados elevados no fluido de grandes folículos. Sendo assim, os autores desse estudos sugeriram que os metabólitos, acima citados, podem estar relacionados à qualidade dos oócitos em porcas (BERTOLDO et al., 2013). Em vacas leiteiras, também, foi identificada a presença

de elevadas concentrações de glicose no fluido folicular de grandes folículos. Além disso, foi demonstrada uma forte correlação entre os níveis de glicose no soro sanguíneo e no fluido folicular de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo que essa correlação foi ainda mais evidenciada no fluido de grandes folículos (SHABANKAREH et al., 2013). Assim sendo, os resultados obtidos por Shabankareh et al. (2013) demonstram evidências que existe uma relação entre os metabólitos presentes no soro sanguíneo e no fluido dos folículos ovarianos.

2.2.2 Aplicação da abordagem metabolômica no estudo da reprodução masculina

Os métodos convencionais de avaliação de sêmen fornecem limitadas informações quanto ao diagnóstico de infertilidade. Com intuito de superar essas limitações, a abordagem metabolômica tem se mostrado uma poderosa ferramenta na avaliação de patologias reprodutivas masculinas, visto que esta abordagem auxilia na compreensão mais profunda dos mecanismos e vias metabólicas relacionados com a fertilidade masculina (DEEPINDER et al., 2007; AITKEN, 2010). Deste modo, a metabolômica é um método promissor para identificar possíveis biomarcadores de fertilidade e infertilidade masculina (DEEPINDER et al., 2007; KOVAC et al., 2013). A presença, ausência e/ou alterações de metabólitos específicos podem estar relacionadas à fisiologia dos espermatozoides, e tais informações podem permitir um diagnóstico precoce associado a um melhor tratamento da infertilidade (AITKEN, 2010).

Após análises por RMN, biomarcadores associados à fertilidade foram encontrados no plasma seminal e no soro sanguíneo de touros de alta e baixa fertilidade. Alguns metabólitos, incluindo o citrato, triptamina, taurina e leucina foram identificados como possíveis biomarcadores de fertilidade no plasma seminal dos touros. Já outros metabólitos, como a asparagina, glicogênio, citrulina e isoleucina, foram identificados no plasma sanguíneo desses animais (KUMAR et al., 2015). Utilizando a técnica de RMN, Hamamah et al. (1998) observaram um aumento das proporções de colina e citrato, colina e lactato e glicerolfosforilcolina e colina no plasma seminal de homens com falha na produção espermática, comparado a homens com azoospermia obstrutiva. Após análises com cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (CL-EM), em combinação com análises de bioinformática e análises multivariadas, diversos marcadores moleculares foram identificados na urina de homens com infertilidade normozoospermica. Neste estudo, o leucotrieno E4, a 3-hidroxi palmitoilcarnitina, o aspartato, a xantosina e o metoxitriptofano

foram descritos como potenciais biomarcadores de infertilidade masculina (ZHANG; MU; et al., 2014). Adicionalmente, em outro estudo realizado por Gilany et al. (2014) foi proposto um modelo para classificação de pacientes com astenozoospermia por meio de análises do plasma seminal utilizando-se a espectroscopia Raman. Neste contexto, os estudos têm evidenciado que técnicas metabolômicas podem ser empregadas para identificar possíveis marcadores moleculares de fertilidade em homens e nos animais domésticos.

2.2.3 Outros empregos da metabolômica na biologia reprodutiva

A abordagem metabolômica tem sido utilizada para prever problemas reprodutivos em mulheres e para monitorar a saúde materna e fetal durante a gestação (HORGAN et al., 2009). Sun et al. (2012), por meio da análise metabolômica empregando a técnica de RMN, demonstraram diferenças no metaboloma do plasma sanguíneo de mulheres com síndrome do ovário policístico (SOP). Os autores observaram baixas concentrações de creatinina, colina, glicerosfocolina/fosfocolina, citrato e alguns aminoácidos e altas concentrações dimetilamina, lactato, creatina e N-acetil no plasma de pacientes com SOP. O RMN demonstrou ser uma excelente ferramenta para determinar marcadores metabólicos de malformações fetais, uma vez que essa técnica permite detectar alterações significativas em alguns metabólitos, tais como: ascorbato, isoleucina, serina, treonina, N-metilnicotinamida, hipoxantina, ácido 3-hidroxi-butírico e acetona no plasma sanguíneo, urina e líquido amniótico de mulheres gestantes que possuem fetos com má-formação (GRACA et al., 2010; DIAZ et al., 2011). Além disso, as análises metabolômicas de biofluidos maternos têm sido utilizadas para desenvolver métodos de diagnóstico precoce e para elucidar mecanismos envolvidos em distúrbios como diabetes mellitus gestacional, pré-eclâmpsia (GRACA et al., 2010; KENNY et al., 2010; ODIBO et al., 2011), diminuição do crescimento fetal (MAITRE et al., 2014) e parto prematuro (GRACA et al., 2010; MAITRE et al., 2014).

2.3 ANIMAIS DE PRODUÇÃO COMO MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS REPRODUTIVOS EM SERES HUMANOS UTILIZANDO A ABORDAGEM METABOLÔMICA

Os animais de produção têm sido utilizados como modelos para a pesquisa de fisiopatologias humanas devido às suas características fisiológicas específicas, semelhantes às de seres humanos. Além disso, algumas observações experimentais requererem um período prolongado de pesquisa, que muitas vezes não é possível quando se utilizam apenas animais de laboratório, como ratos e camundongos. Outro aspecto em relação ao emprego de animais de produção como modelos experimentais, é que os animais de laboratório geralmente possuem uma elevada percentagem de endogamia, não apresentando, portanto, a diversidade genética que é comumente observada em grandes animais e em humanos. Desta forma, animais de produção, incluindo bovinos, caprinos, ovinos e suínos têm se mostrado modelos adequados para a pesquisa em diversos campos da saúde humana. Entre estes campos, podem-se citar a utilização de xenotrasplantes, proteínas recombinantes, medicamentos e alimentos e, emprego de tecnologias reprodutivas, incluindo a transgênese, clonagem e produção *in vitro* (PIV) de embriões (KUES; NIEMANN, 2004; BAHR; WOLF, 2012).

No campo da biologia reprodutiva, o uso de animais de produção como modelo para estudos em seres humanos tem se mostrado uma ferramenta poderosa, visto que as pesquisas com animais domésticos têm permitido avanços notáveis na aplicação de abordagens moleculares em reprodução e biotecnologias reprodutivas (BENDER et al., 2010; BERTOLDO et al., 2013; SHABANKAREH et al., 2013; MUÑOZ et al., 2014; MUÑOZ et al., 2014; KUMAR et al., 2015). Associado a estes avanços, nos animais domésticos de grande porte, principalmente em bovinos, as taxas de fertilização têm sido bem controladas e existem constantes pesquisadas para melhorar a produção desses animais, o que os tornam excelentes modelos para o estudo da fertilidade humana (SUTOVSKY et al., 1996; KUES; NIEMANN, 2004). Embora os estudos de reprodução em seres humanos utilizando abordagens metabolômicas tenham avançado, essa metodologia requer uma grande amostragem homogênea, o que limita os estudos empregando esta técnica. Desta forma, os estudos metabolômicos empregando animais de produção podem ser vantajosos, devido a facilidade de aquisição de amostras, as quais podem ser obtidas em fazendas e abatedouros, bem como, devido à disponibilidade de dados fenotípicos relacionados à reprodução desses animais (DUNN et al., 2011).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avanços recentes na biologia molecular permitiram a descoberta de biomarcadores associados a condições fisiológicas e patológicas. Adicionalmente, esses avanços têm auxiliado no progresso de estudos com medicamentos e seus efeitos tóxicos, técnicas de diagnóstico não invasivo em tecidos, biofluidos (sangue, urina, fezes, plasma seminal, saliva, bile, fluido folicular) e culturas celulares. Embora a aplicação da metabolômica seja encorajadora na biologia reprodutiva, o estado atual desta abordagem ainda tem várias limitações, particularmente para a análise de grandes conjuntos de dados usando métodos estatísticos apropriados e programas de bioinformática. Além disso, os estudos com metabolômica têm ajudado a identificar inúmeras classes de substâncias associadas a diferentes vias metabólicas, o que leva a desafios na interpretação dos resultados (GOODACRE et al., 2004; SINGH; SINCLAIR, 2007; NOACK; WIECHERT, 2014). Desta forma, se faz necessária a realização de pesquisas básicas e aplicadas para aumentar a sensibilidade e a versatilidade dos métodos empregados, permitindo o avanço de pesquisas no campo da biologia e biotecnologia. Apesar de atualmente a metabolômica estar sendo mais aplicada em estudos de biologia reprodutiva humana do que de animais domésticos, como os bovinos, essa abordagem oferece uma grande oportunidade para desenvolver soluções científicas com o intuito de aumentar a eficiência da produção animal e dos seus subprodutos. Além disso, os grandes animais podem ser considerados modelos adequados para estudos metabolômicos em seres humanos, devido à disponibilidade de amostras e dados fenotípicos, bem como devido ao avançado uso de tecnologias reprodutivas *in vivo* e *in vitro* nos animais de produção. Em conclusão, a metabolômica poderá ser uma ferramenta essencial para compreender os potenciais de desenvolvimento de embriões pré-implantação, prever a fertilidade masculina e feminina, e diagnosticar os distúrbios reprodutivos masculinos e femininos precocemente nos animais e nos seres humanos.

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. **Asian J Androl**, v. 12, n. 1, p. 99-103, 2010.

BAHR, A.; WOLF, E. Domestic animal models for biomedical research. **Reprod Domest Anim**, v. 47 Suppl 4, p. 59-71, 2012.

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 1047-55, 2010.

BERTOLDO, M. J.; NADAL-DESBARATS, L.; GERARD, N.; DUBOIS, A.; HOLYOAKE, P. K.; GRUPEN, C. G. Differences in the metabolomic signatures of porcine follicular fluid collected from environments associated with good and poor oocyte quality. **Reproduction**, v. 146, n. 3, p. 221-31, 2013.

BROMER, J. G.; SELI, E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 20, n. 3, p. 234-41, 2008.

CHEN, R.; MIAS, G. I.; LI-POOK-THAN, J.; JIANG, L.; LAM, H. Y.; MIRIAMI, E.; KARCZEWSKI, K. J.; HARIHARAN, M.; DEWEY, F. E.; CHENG, Y.; CLARK, M. J.; IM, H.; HABEGGER, L.; BALASUBRAMANIAN, S.; O'HUALLACHAIN, M.; DUDLEY, J. T.; HILLENMEYER, S.; HARAKSINGH, R.; SHARON, D.; EUSKIRCHEN, G.; LACROUTE, P.; BETTINGER, K.; BOYLE, A. P.; KASOWSKI, M.; GRUBERT, F.; SEKI, S.; GARCIA, M.; WHIRL-CARRILLO, M.; GALLARDO, M.; BLASCO, M. A.; GREENBERG, P. L.; SNYDER, P.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B.; BUTTE, A. J.; ASHLEY, E. A.; GERSTEIN, M.; NADEAU, K. C.; TANG, H.; SNYDER, M. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1293-307, 2012.

DEEPINDER, F.; CHOWDARY, H. T.; AGARWAL, A. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 7, n. 4, p. 351-8, 2007.

DIAZ, S. O.; PINTO, J.; GRAÇA, G.; DUARTE, I. F.; BARROS, A. S.; GALHANO, E.; PITA, C.; ALMEIDA, M. o. C.; GOODFELLOW, B. J.; CARREIRA, I. M.; GIL, A. M. Metabolic biomarkers of prenatal disorders: an exploratory NMR metabonomics study of second trimester maternal urine and blood plasma. **J Proteome Res**, v. 10, n. 8, p. 3732-42, 2011.

DUDZIK, D.; ZORAWSKI, M.; SKOTNICKI, M.; ZARZYCKI, W.; KOZLOWSKA, G.; BIBIK-MALINOWSKA, K.; VALLEJO, M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C.; RAMOS, M. P. Metabolic fingerprint of Gestational Diabetes Mellitus. **J Proteomics**, v. 103, p. 57-71, 2014.

DUNN, W. B.; BAILEY, N. J.; JOHNSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **Analyst**, v. 130, n. 5, p. 606-25, 2005.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 1, p. 387-426, 2011.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 285-294, 2005.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comp Funct Genomics**, v. 2, n. 3, p. 155-68, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol Biol**, v. 48, n. 1-2, p. 155-71, 2002.

GILANY, K.; MOAZENI-POURASIL, R. S.; JAFARZADEH, N.; SAVADI-SHIRAZ, E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. **Mol Reprod Dev**, v. 81, n. 1, p. 84-6, 2014.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alphaV and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 468-74, 2007.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 5, p. 245-52, 2004.

GRACA, G.; DUARTE, I. F.; BARROS, A. S.; GOODFELLOW, B. J.; DIAZ, S. O.; PINTO, J.; CARREIRA, I. M.; GALHANO, E.; PITA, C.; GIL, A. M. Impact of prenatal disorders on the metabolic profile of second trimester amniotic fluid: a nuclear magnetic resonance metabonomic study. **J Proteome Res**, v. 9, n. 11, p. 6016-24, 2010.

HAMAMAH, S.; SEGUIN, F.; BUJAN, L.; BARTHELEMY, C.; MIEUSSET, R.; LANSAC, J. Quantification by magnetic resonance spectroscopy of metabolites in seminal plasma able to differentiate different forms of azoospermia. **Hum Reprod**, v. 13, n. 1, p. 132-5, 1998.

HOLLYWOOD, K.; BRISON, D. R.; GOODACRE, R. Metabolomics: current technologies and future trends. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4716-23, 2006.

HOLMES, E.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Metabolic phenotyping in health and disease. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 714-7, 2008.

HORGAN, R. P.; CLANCY, O. H.; MYERS, J. E.; BAKER, P. N. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. **BJOG**, v. 116, n. 2, p. 173-81, 2009.

KENNY, L. C.; BROADHURST, D. I.; DUNN, W.; BROWN, M.; NORTH, R. A.; MCCOWAN, L.; ROBERTS, C.; COOPER, G. J.; KELL, D. B.; BAKER, P. N.; CONSORTIUM, S. f. P. E. Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers. **Hypertension**, v. 56, n. 4, p. 741-9, 2010.

KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; LAMB, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 998-1007, 2013.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 6, p. 286-94, 2004.

KUMAR, A.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P.; ANZAR, M. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: 1H nuclear magnetic resonance analysis. **Mol Reprod Dev**, v. 82, n. 2, p. 123-31, 2015.

MAITRE, L.; FTHENOU, E.; ATHERSUCH, T.; COEN, M.; TOLEDANO, M. B.; HOLMES, E.; KOGEVINAS, M.; CHATZI, L.; KEUN, H. C. Urinary metabolic profiles in early pregnancy are associated with preterm birth and fetal growth restriction in the Rhea mother-child cohort study. **BMC Med**, v. 12, p. 110, 2014.

MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; ZICARELLI, L.; KILLIAN, G. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 450-7, 2009.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 2, p. 214-22, 2007.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **J Androl**, v. 27, n. 4, p. 534-41, 2006.

MUÑOZ, M.; UYAR, A.; CORREIA, E.; DÍEZ, C.; FERNANDEZ-GONZALEZ, A.; CAAMAÑO, J.; TRIGAL, B.; CARROCERA, S.; SELI, E.; GOMEZ, E. Non-invasive assessment of embryonic sex in cattle by metabolic fingerprinting of in vitro culture medium. **Metabolomics**, v. 10, p. 443-451, 2014.

MUÑOZ, M.; UYAR, A.; CORREIA, E.; PONSART, C.; GUYADER-JOLY, C.; MARTÍNEZ-BELLO, D.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; FERNANDEZ-GONZALEZ, A.; DÍEZ, C.; CAAMAÑO, J. N.; TRIGAL, B.; HUMBLLOT, P.; CARROCERA, S.; MARTIN, D.; SELI, E.; GOMEZ, E. Metabolomic prediction of pregnancy viability in superovulated cattle embryos and recipients with fourier transform infrared spectroscopy. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 608579, 2014.

NAGY, Z. P.; SAKKAS, D.; BEHR, B. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). **Reprod Biomed Online**, v. 17, n. 4, p. 502-7, 2008.

NOACK, S.; WIECHERT, W. Quantitative metabolomics: a phantom? **Trends Biotechnol**, v. 32, n. 5, p. 238-44, 2014.

O'GORMAN, A.; WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M. J.; MCAULIFFE, F. M.; WINGFIELD, M.; BRENNAN, L. Metabolic profiling of human follicular fluid identifies

potential biomarkers of oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 146, n. 4, p. 389-95, 2013.

ODIBO, A. O.; GOETZINGER, K. R.; ODIBO, L.; CAHILL, A. G.; MACONES, G. A.; NELSON, D. M.; DIETZEN, D. J. First-trimester prediction of preeclampsia using metabolomic biomarkers: a discovery phase study. **Prenat Diagn**, v. 31, n. 10, p. 990-4, 2011.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 9, p. 373-8, 1998.

PAIVA, C.; AMARAL, A.; RODRIGUEZ, M.; CANYELLAS, N.; CORREIG, X.; BALLESCA, J. L.; RAMALHO-SANTOS, J.; OLIVA, R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance ((1) H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology**, v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 263-9, 2012.

PAULING, L.; ROBINSON, A. B.; TERANISHI, R.; CARY, P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 10, p. 2374-6, 1971.

SELI, E.; BOTROS, L.; SAKKAS, D.; BURNS, D. H. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 90, n. 6, p. 2183-9, 2008.

SELI, E.; ROBERT, C.; SIRARD, M. A. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 8, p. 513-30, 2010.

SELI, E.; SAKKAS, D.; SCOTT, R.; KWOK, S. C.; ROSENDAHL, S. M.; BURNS, D. H. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 88, n. 5, p. 1350-7, 2007.

SELI, E.; VERGOUW, C. G.; MORITA, H.; BOTROS, L.; ROOS, P.; LAMBALK, C. B.; YAMASHITA, N.; KATO, O.; SAKKAS, D. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. **Fertil Steril**, v. 94, n. 2, p. 535-42, 2010.

SHABANKAREH, H. K.; KOR, N. M.; HAJARIAN, H. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v. 140, n. 3-4, p. 109-14, 2013.

SINGH, R.; SINCLAIR, K. D. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S56-62, 2007.

SUN, L.; HU, W.; LIU, Q.; HAO, Q.; SUN, B.; ZHANG, Q.; MAO, S.; QIAO, J.; YAN, X. Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients. **J Proteome Res**, v. 11, n. 5, p. 2937-46, 2012.

SUTOVSKY, P.; HEWITSON, L.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. Molecular medical approaches for alleviating infertility and understanding assisted reproductive technologies. **Proc Assoc Am Physicians**, v. 108, n. 6, p. 432-43, 1996.

WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M. J.; MCAULIFFE, F. M.; WINGFIELD, M.; BRENNAN, L. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. **Fertil Steril**, v. 97, n. 5, p. 1078-84.e1-8, 2012.

ZHANG, J.; HUANG, Z.; CHEN, M.; XIA, Y.; MARTIN, F. L.; HANG, W.; SHEN, H. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men. **Fertil Steril**, v. 102, n. 1, p. 44-53.e12, 2014.

ZHANG, J.; MU, X.; XIA, Y.; MARTIN, F. L.; HANG, W.; LIU, L.; TIAN, M.; HUANG, Q.; SHEN, H. Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men. **J Proteome Res**, v. 13, n. 6, p. 3088-99, 2014.

ZHOU, X.; WANG, Y.; YUN, Y.; XIA, Z.; LU, H.; LUO, J.; LIANG, Y. A potential tool for diagnosis of male infertility: Plasma metabolomics based on GC-MS. **Talanta**, v. 147, p. 82-9, 2016.

3 CAPÍTULO II

MARCADORES METABÓLICOS DE FERTILIDADE NO PLASMA SEMINAL DE TOUROS

Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma

(Artigo submetido para publicação no periódico *Biology of Reproduction*)

Marcadores metabólicos de fertilidade no plasma seminal de touros

RESUMO

Os metabólitos desempenham papéis essenciais nos sistemas biológicos de animais domésticos. No entanto, o perfil metabolômico do plasma seminal de touros, sua importância e sua relação com a fertilidade destes animais ainda não são totalmente esclarecidos. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram determinar o metaboloma do plasma seminal de touros com diferentes escores de fertilidades e identificar metabólitos que se apresentam como potenciais marcadores de fertilidade nesses animais. O metaboloma do plasma seminal de 16 touros com alta e baixa fertilidade foi determinado por meio de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas multivariadas e univariadas. Além disso, análises de bioinformática foram realizadas a fim de identificar as vias metabólicas associadas aos metabólitos do plasma seminal dos touros. Assim sendo, sessenta e três metabólitos foram identificados no plasma seminal dos touros. A frutose foi detectada como o metabólito mais abundante, seguido por ácido cítrico, ácido láctico, ureia e ácido fosfórico. Já a androstenediona, 4-cetoglicose, D-xilofuranose, ácido 2-oxoglutárico e o ácido eritrônico foram os metabólitos menos abundantes identificados no plasma seminal desses animais. A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) demonstrou que houve uma separação distinta entre os touros de alta e de baixa fertilidade. Os metabólitos com as maiores pontuações de Importância da Variável na Projeção (VIP > 2) foram o ácido 2-oxoglutárico e a frutose. A análise do mapa de calor (*heatmap*), com base na pontuação de VIP, e as análises univariadas indicaram que o ácido 2-oxoglutárico foi significativamente menor ($P = 0,02$) e a frutose foi significativamente maior ($P = 0,02$) em touros de alta fertilidade quando comparados com touros de baixa fertilidade. Estes resultados são significativos, pois o presente estudo foi o primeiro a identificar o perfil metabolômico do plasma seminal do touro utilizando a técnica de CG-EM e o primeiro a mostrar o ácido 2-oxoglutárico e a frutose como potenciais biomarcadores de fertilidade nesses animais.

Palavras-chave: biomarcadores, metabolômica, metabólitos, reprodução masculina, sêmen.

Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma

ABSTRACT

Metabolites play essential roles in biological systems; however, detailed identities and significance of the seminal plasma metabolome related to bull fertility are not known. The objectives of this study were to determine comprehensive metabolome of seminal plasma from Holstein bulls with differing fertility, and to ascertain the potential of metabolites as biomarkers of bull fertility. The seminal plasma metabolome from 16 Holstein bulls with two fertility rates were determined by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Multivariate and univariate analyses of the data were performed. From this, the pathways associated with the seminal plasma metabolome were identified using bioinformatics approaches. The results showed that 63 metabolites were identified in the seminal plasma of all bulls. Fructose was the most abundant metabolite detected, followed for citric acid, lactic acid, urea and phosphoric acid. However, androstenedione, 4-ketoglucose, D-xylofuranose, 2-oxoglutaric acid and erythronic acid were the least predominant metabolites found in this fluid. PLS-DA revealed a distinct separation between high and low fertility bulls, as regard to scores plot. The metabolites with the greatest VIP score ($VIP > 2$) were 2-oxoglutaric acid and fructose. Heat-map analysis, based on VIP score, and univariate analysis indicated that 2-oxoglutaric acid was less ($P = 0.02$) and fructose was significantly greater ($P = 0.02$) in high-fertility bulls than in low-fertility bulls. These findings are significant because the current study is the first to identify the comprehensive metabolomic profiling of bull seminal plasma and presented the potential of metabolites such as 2-oxoglutaric acid and fructose as biomarkers of bull fertility using GC-MS.

Keywords: metabolomics, metabolites, biomarkers, male reproduction, semen.

3.1 INTRODUÇÃO

A fertilidade do touro está relacionada com a habilidade deste animais em produzir espermatozoides com capacidade de fertilizar um oócito, resultando em uma descendência viva (PETHERICK, 2005). A fertilidade pode ser afetada por uma série de fatores, incluindo manejo, nutrição, doenças, estresse, idade e genética (PETHERICK, 2005; CHENOWETH, 2007; FERLIN; FORESTA, 2014). A redução da fertilidade de um touro pode afetar a taxa de concepção dos rebanhos, resultando na diminuição da produção e, portanto, da lucratividade dos criadores. Nesse contexto, a capacidade de prever a fertilidade desses animais oferece um enorme benefício para o sucesso econômico da pecuária, devido à melhoria nas taxas de prenhes do rebanho (BRAHMKSHTRI et al., 1999; HOLROYD et al., 2002; PARKINSON, 2004; MOCÉ; GRAHAM, 2008). Desta forma, as abordagens "ômicas", tais como: genômica, transcriptômica e proteômica, têm sido empregadas para determinar os marcadores moleculares de fertilidade de touros. Como resultado, os estudos utilizando essas técnicas têm demonstrado que algumas moléculas encontradas no espermatozoide e no plasma seminal de bovinos estão significativamente associadas com a fertilidade desses animais (MOURA et al., 2006; MOURA et al., 2007; FEUGANG et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2013; BROMFIELD, 2016; REGO et al., 2016; WESTFALEWICZ et al., 2017).

A metabolômica, a qual é outra abordagem "ômica", tem sido aplicada para uma melhor compreensão dos processos biológicos relacionados à reprodução animal (SELI et al., 2010; GOODSON et al., 2012; KOVAC et al., 2013; MUÑOZ et al., 2014). Esta abordagem permite a identificação e a quantificação de pequenas moléculas, incluindo aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, carboidratos, entre outros, em uma determinada secreção, célula, tecido e órgão (OLIVER et al., 1998; FIEHN, 2001, 2002; DUNN et al., 2005). Revelando, portanto, informações sobre mecanismos moleculares e reações metabólicas, os quais podem ajudar a detectar biomarcadores de fenótipos que se tem interesse (FIEHN, 2001, 2002; GOODACRE et al., 2004; DUNN et al., 2005; HOLLYWOOD et al., 2006; PATTI et al., 2012). Deste modo, a abordagem metabolômica tem sido aplicada para identificar potenciais biomarcadores de fertilidade no plasma seminal de touros (KUMAR et al., 2015) e homens (HAMAMAH et al., 1993; HAMAMAH et al., 1998; DEEPINDER et al., 2007; KOVAC et al., 2013; GILANY et al., 2014).

Além disso, um estudo recente revelou que a técnica metabolômica de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM) pode ser um método inovador para o diagnóstico rápido e não invasivo de infertilidade masculina (ZHOU et al., 2016). As análises

do plasma seminal humano, utilizando espectroscopia Raman, também, permitiram a identificação de metabólitos associados com a astenozoospermia (GILANY et al., 2014). Em outro estudo, a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) detectou menores concentrações de glicerofosfocolina, citrato e lactato no fluido seminal de homens azoospermicos do que em indivíduos normozoospermicos (HAMAMAH et al., 1993). Esses achados sugerem que as análises metabolômicas são ferramentas válidas para a identificação de muitas classes de moléculas que estão associadas a diversas vias metabólicas, essenciais ao sucesso reprodutivo (SELI et al., 2010; KOVAC et al., 2013; MUÑOZ et al., 2014).

Embora as ferramentas metabolômicas venham sendo empregadas para estudar a fertilidade dos homens (HAMAMAH et al., 1993; HAMAMAH et al., 1998; DEEPINDER et al., 2007; GILANY et al., 2014; ZHOU et al., 2016), existe um número limitado de estudos utilizando essa abordagem em animais de produção. Desta forma, ainda existem muitas lacunas no conhecimento, incluindo a identidade dos metabólitos, suas concentrações no plasma seminal de touros, bem como os mecanismos moleculares nos quais eles estão envolvidos e que estão relacionados a fertilidade desses animais. Sendo assim, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de determinar o perfil metabolômico do plasma seminal de touros empregando a CG-EM. Além disso, foi testada a hipótese de que existem diferenças no perfil metabolômico do plasma seminal de touros com diferentes taxas de fertilidades *in vivo*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 *Desenho experimental*

A ampla análise metabolômica do plasma seminal de touros (n = 16) com diferentes taxas de fertilidade *in vivo* foi realizada utilizando CG-EM. Por meio de ferramentas de bioinformática, esses metabólitos foram selecionados como potenciais biomarcadores em touros de alta (n = 8) e baixa (n = 8) fertilidade.

3.2.2 Coleta das amostras e determinação da fertilidade dos touros

As amostras de plasma seminal de 16 touros com diferentes fenótipos de fertilidade foram fornecidas pela empresa *Alta Genetics* (Watertown, WI, EUA). O sêmen foi coletado com vagina artificial e, o plasma seminal foi separado dos espermatozoides por centrifugação ($700 \times g$, 4°C , 10 min). O plasma seminal foi, então, transferido para um tubo de 2 mL e centrifugado novamente ($10.000 \times g$, 60 min, 4°C), segundo a metodologia utilizada anteriormente (REGO et al., 2014). Após a segunda centrifugação, o plasma seminal foi transferido para um criotubo de 2 mL (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), dividido em alíquotas, congelado e armazenado em nitrogênio líquido e, posteriormente, transportado para a *Mississippi State University* (MSU). Na MSU, o plasma seminal foi imediatamente armazenado a -80°C até a preparação para CG-EM.

Os touros utilizados para este estudo foram selecionados com base em seus escores de fertilidade (Tabela 1), conforme descrito anteriormente por Peddinti et al. (2008). Fatores que influenciam a fertilidade dos touros, como por exemplo, os fatores ambientais e o manejo dos rebanhos, foram ajustados utilizando modelos estatísticos, a fim de se determinar os escores confiáveis de fertilidade (ZWALD et al., 2004). A fertilidade dos touros foi calculada por meio do programa computacional *Probit.F90* (CHANG et al., 2004), e esta foi expressa como a porcentagem de desvio da taxa de concepção de cada bovino em relação a taxa de concepção média de todos os touros. Com base nesse cálculo, o desvio da taxa de concepção em relação a população foi utilizado para classificar os touros. Deste modo, os touros com taxa de concepção acima da média foram classificados como alta fertilidade (AF), e os animais que apresentaram a taxa de concepção abaixo da média foram classificados como baixa fertilidade (BF).

Tabela 1. Fertilidade dos dezesseis touros. Os touros de 1 a 8 foram definidos como animais de alta fertilidade (AF) e os touros de 9 a 16 foram agrupados como baixa fertilidade (BF). A fertilidade de cada touro foi expressa como a percentagem de desvio da taxa de concepção de cada touro em relação à média de todos os touros. O software *Probit.F90* foi usado para estimar a fertilidade.

Número dos touros	Grupos	Número de inseminações	Percentagem (%) de desvio da taxa de concepção do touro em relação à média
1	AF	5293	5,42
2	AF	825	5,1
3	AF	2032	4,8
4	AF	680	4,7
5	AF	779	4,4
6	AF	2487	3,59
7	AF	5751	3,56
8	AF	1488	3,5
9	BF	1604	-3,75
10	BF	2276	-4,06
11	BF	967	-4,49
12	BF	704	-5,6
13	BF	747	-6,3
14	BF	5603	-6,76
15	BF	722	-7,5
16	BF	674	-10,61

3.2.3 Preparação das amostras para as análises de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM)

A preparação das amostras do plasma seminal dos touros para as análises de CG-EM, foi realizada de acordo com o método descrito por Shi et al. (2015), com algumas alterações. Em resumo, uma alíquota de 100 µL de cada amostra ou padrão externo de referência (10 µM, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foi descongelada e transferida para um microtubo de

polipropileno de 2 mL (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Em seguida, um volume de 150 μ L de ácido heptadecanóico em metanol (1 mg/mL, padrão interno, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e 350 μ L de metanol foram, então, adicionados aos microtubos. Posteriormente, estas soluções foram agitadas com *vortex* vigorosamente durante 1 minuto e depois centrifugadas (12.000 x g, 4°C, 10 min). Um volume de 100 μ L de cada sobrenadante foi transferido para “vials âmbar” de 2 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e o solvente foi evaporado com auxílio de um evaporador *TurboVap® LV* (Biotage, Charlotte, NC), por meio de um fluxo suave de nitrogênio a 45°C, até a secagem completa da mistura. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) aos extratos secos, os quais foram agitados com *vortex* vigorosamente durante 1 minuto e, em seguida, aquecidos em banho-maria a 70°C durante 1 hora. As amostras foram, então, derivatizadas por meio da adição de 100 μ L de *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide* com 1% *trimethylchlorosilane* (BSTFA + 1% de TMCS; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e aquecidas novamente em um banho-maria a 70°C durante 1 hora. Logo em seguida, os derivados dos metabólitos foram transferidos para “vials âmbar” com inserção fixa (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) para posterior análise na CG-EM.

3.2.4 Análises de CG-EM

As amostras e os padrões externos de referência foram analisados por meio de um cromatógrafo gasoso (*Agilent 7890A GC System*) acoplado a um espectrômetro de massas (*Agilent 5975C inerte XL MSD*) com detector de massas de três eixos, a um *Agilent 7693 Series Autosampler* e a uma coluna capilar *DB-5MS* (30 m \times 0,25 mm i.d. \times 0,25 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Um volume de 1 μ L de mistura derivatizada foi injetada na entrada (*inlet*) aquecida a 280°C com uma razão de divisão (*split*) de 1:10. A purga do septo padrão foi realizada após a injeção da amostra em uma vazão de 3 mL/min e de gás transportador de hélio em uma vazão de 1 mL/min à um fluxo constante. A linha de transferência do EM, a fonte de íons e o quadrupolo foram aquecidos a 250°C, 230°C e 150°C, respectivamente. O forno do cromatógrafo gasoso foi programado, inicialmente, para ser mantido a 70°C por 4 minutos, seguido de rampa de aquecimento de 8°C/min até 300°C e, então, mantido a 300°C por 5 minutos. A ionização foi realizada em modo de impacto de elétrons a 70 eV. Os espectros de massas foram obtidos com um intervalo de 35-800 m/z à

10.000 uma/s e 10.3 scans/s (intervalos de 0.2 m/z). O tempo de atraso do solvente foi de 6 minutos.

Todos os compostos foram identificados baseados na comparação dos seus tempos de retenção, de um íon alvo e de dois íons quantitativos presentes nos seus espectros de massas, com os íons dos espectros de massas disponíveis na biblioteca *NIST Mass Spectral Search Program* (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Versão 2.0), e com os íons dos espectros de massas dos padrões externos de referência. Entre os metabólitos detectados, vinte e quatro foram autenticados através desses padrões externos de referência. Todos os metabólitos identificados foram categorizados de acordo com suas classes químicas. As abundâncias dos íons-alvo de cada metabólito foram divididas pela abundância do íon-alvo do padrão interno (ácido heptadecanóico) e as razões de abundância obtidas por esse cálculo foram utilizadas para a análise estatística (SHI et al., 2015).

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística das razões das abundâncias foi realizada pela inserção dos dados no programa *MetaboAnalyst 3.0* (<http://www.metaboanalyst.ca>) (XIA et al., 2015). A matriz de dados gerada foi normalizada pela soma constante e autoescalada, e em seguida foram realizadas as análises multivariadas e univariadas. Nas análises multivariadas, foi utilizada a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) seguida do cálculo da Importância da Variável na Projeção (VIP), baseada no modelo PLS-DA, a qual foi calculada para identificar os potenciais biomarcadores de fertilidade. Os metabólitos com $VIP > 1,5$ foram consideradas importantes para a separação dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF) (XIA; WISHART, 2011; KUMAR et al., 2015; XIA et al., 2015). As análises univariadas foram realizadas utilizando-se um teste t de *Student* para identificar os metabólitos com diferença significativa ($P < 0,05$) entre os touros de AF e BF. A análise de correlação entre todos os metabólitos do plasma seminal dos touros foi determinada usando a correlação de *Pearson* ($P < 0,05$) (XIA; WISHART, 2011; XIA et al., 2015).

3.2.6 Análise *in silico* das redes metabólicas

A bioinformática foi utilizada para visualizar redes e vias metabólicas. As redes metabólicas relacionadas aos metabólitos mais abundantes encontrados no plasma seminal dos touros, bem como, relacionadas aos dois metabólitos com os maiores escores de VIP, foram analisadas usando o programa computacional *Metscape*, versão 3.1.2, o qual é um plug-in do programa *Cytoscape*, versão 3.2.1 (<http://www.cytoscape.org>). A Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) foi usada para a identificação dos compostos (KARNOVSKY et al., 2012).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Metaboloma do plasma seminal de touros

Após a análise do plasma seminal dos touros utilizando a CG-EM, foi observado um total de 73 picos, independentemente dos escores de fertilidade. Destes picos, 63 metabólitos foram identificados e classificados de acordo com as suas principais classes químicas, incluindo aminoácidos, peptídeos e análogos; carboidratos e carboidratos conjugados; ácidos graxos e conjugados; esteroides e esteroides derivados; nucleosídeos, nucleotídeos e análogos, além de outros compostos orgânicos e inorgânicos (Tabela 2). Entre os 63 metabólitos identificados no presente estudo, 24 metabólitos foram autenticados pelos padrões externos de referências e 39 foram identificados por comparação (*match*) com os espectros de massas encontrados na biblioteca *NIST Mass Spectral Search Program*. Desta forma, a tabela 2 apresenta todos os metabólitos identificados no plasma seminal dos touros com os seus tempos de retenção, íons alvos e os seus dois íons quantitativos e, a figura 1 mostra um cromatograma característico de CG do plasma seminal desses animais com a identificação de alguns picos de metabólitos importantes.

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos (*continua*).

Metabólitos e classes químicas	Forma de identificação	Tempo de retenção (minutos)	Íon alvo (m/z)	Íon quantitativo 1 (m/z)	Íon quantitativo 2 (m/z)
<i>Aminoácidos, peptídeos e análogos</i>					
Amino-butirolactona	NIST	6,15	130	73	158
L-alanina	Padrão	9,12	116	73	147
Ácido aminobutírico	NIST	11,42	147	73	174
Valina	Padrão	11,46	144	73	218
L-leucina	Padrão	12,52	158	73	147
L-iso-leucina	Padrão	12,92	158	73	218
Glicina	Padrão	13,13	130	73	147
Norvalina	Padrão	13,58	232	73	144
Serina	Padrão	14,15	204	73	218
L-treonina	Padrão	14,62	218	73	117
Beta-alanina	Padrão	15,20	174	73	147

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos (*continuação*).

Metabólitos e classes químicas	Forma de identificação	Tempo de retenção (minutos)	Íon alvo (m/z)	Íon quantitativo 1 (m/z)	Íon quantitativo 2 (m/z)
Ácido aminomalônico	NIST	15,96	147	73	218
2-Pirrolidona-5-ácido carboxílico	NIST	16,19	84	73	147
Ácido piroglutâmico	Padrão	16,70	156	73	147
L- ácido aspártico	Padrão	16,74	232	73	147
L-prolina	Padrão	16,83	140	73	230
DL-ornitina	Padrão	18,12	142	174	420
Ácido glutâmico	Padrão	18,20	246	73	128
DL-fenilalanina	Padrão	18,27	218	73	192
L-lisina	Padrão	22,27	174	73	317
L-tirosina	Padrão	22,48	218	73	147
<i>Carboidratos e seus conjugados</i>					
Glicerol	Padrão	12,63	147	73	205

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos (*continuação*).

Metabólitos e classes químicas	Forma de identificação	Tempo de retenção (minutos)	Íon alvo (m/z)	Íon quantitativo 1 (m/z)	Íon quantitativo 2 (m/z)
Meso-eritritol	NIST	16,66	147	73	217
Ácido eritrônico	NIST	17,47	147	73	292
D-xilofuranosa	NIST	17,51	82	73	110
Ribitol	NIST	19,89	103	73	147
D-psicofuranosa	NIST	20,96	217	438	75
D-fructopiranososa	NIST	21,16	204	73	147
D-frutose	Padrão	21,90	103	73	217
D-manitol	NIST	22,61	147	73	319
D-sorbitol	NIST	22,70	147	73	319
D-glicero-D-gulo-heptose	NIST	27,85	103	73	147
Dulcitol	NIST	27,93	103	73	147

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos (*continuação*).

Metabólitos e classes químicas	Forma de identificação	Tempo de retenção (minutos)	Íon alvo (m/z)	Íon quantitativo 1 (m/z)	Íon quantitativo 2 (m/z)
<i>Ácidos graxos e seus conjugados</i>					
Ácido metilmaleíco	NIST	13,90	147	73	259
Ácido málico	NIST	16,25	147	73	233
Ácido hexadecanóico	Padrão	23,55	117	73	132
Ácido esteárico	NIST	25,77	117	73	341
<i>Esteroides e derivados</i>					
Androstenediona	NIST	29,01	147	73	91
Colesterol	Padrão	34,53	129	73	207

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos (*continuação*)

Metabólitos e classes químicas	Forma de identificação	Tempo de retenção (minutos)	Íon alvo (m/z)	Íon quantitativo 1 (m/z)	Íon quantitativo 2 (m/z)
<i>Nucleosídeos, nucleotídeos e análogos</i>					
Inosina	NIST	29,40	217	73	207
5-Metiluridina	NIST	29,77	217	73	147
<i>Outros compostos orgânicos</i>					
Propileno glicol	NIST	6,81	117	73	147
Pirrolidinona	NIST	7,55	99	71	152
Ácido láctico	NIST	8,21	117	73	147
Pentano	NIST	9,72	85	69	55
Ácido oxálico	NIST	9,93	147	73	133
Ureia	Padrão	11,83	147	73	189

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos (*continuação*).

Metabólitos e classes químicas	Forma de identificação	Tempo de retenção (minutos)	Íon alvo (m/z)	Íon quantitativo 1 (m/z)	Íon quantitativo 2 (m/z)
Ácido benzoico	NIST	11,91	105	77	179
Ácido butanedióico	NIST	13,20	147	73	247
Ácido fumárico	NIST	13,78	245	73	147
Creatinina enol	NIST	17,26	115	73	100
Ácido 2-oxoglutárico	Padrão	17,55	147	73	75
Amino-metil-propanediol	NIST	17,89	188	73	100
Ácido aconítico	NIST	19,98	229	67	375
4-cetoglucose	NIST	20,05	89	59	392
Ácido hipúrico	NIST	20,72	105	73	206
Ácido cítrico	Padrão	21,10	147	73	273
Ácido carbônico	NIST	22,82	71	58	147
Mio-inositol	NIST	24,49	147	73	217
Ácido úrico	NIST	24,53	442	73	457
p-Tolyl-beta-D-glucuronide	NIST	28,09	180	73	147

Tabela 2. Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM. Os metabólitos identificados pelos padrões externos e pela biblioteca NIST foram classificados com base nas suas classes químicas. Os metabólitos foram identificados pelos seus tempos de retenção, por um íon alvo e por dois íons quantitativos (*conclusão*).

Metabólitos e classes químicas	Forma de identificação	Tempo de retenção (minutos)	Íon alvo (m/z)	Íon quantitativo 1 (m/z)	Íon quantitativo 2 (m/z)
<i>Compostos inorgânicos</i>					
Borato	NIST	11,00	221	73	248
Ácido fosfórico	NIST	20,33	299	73	357

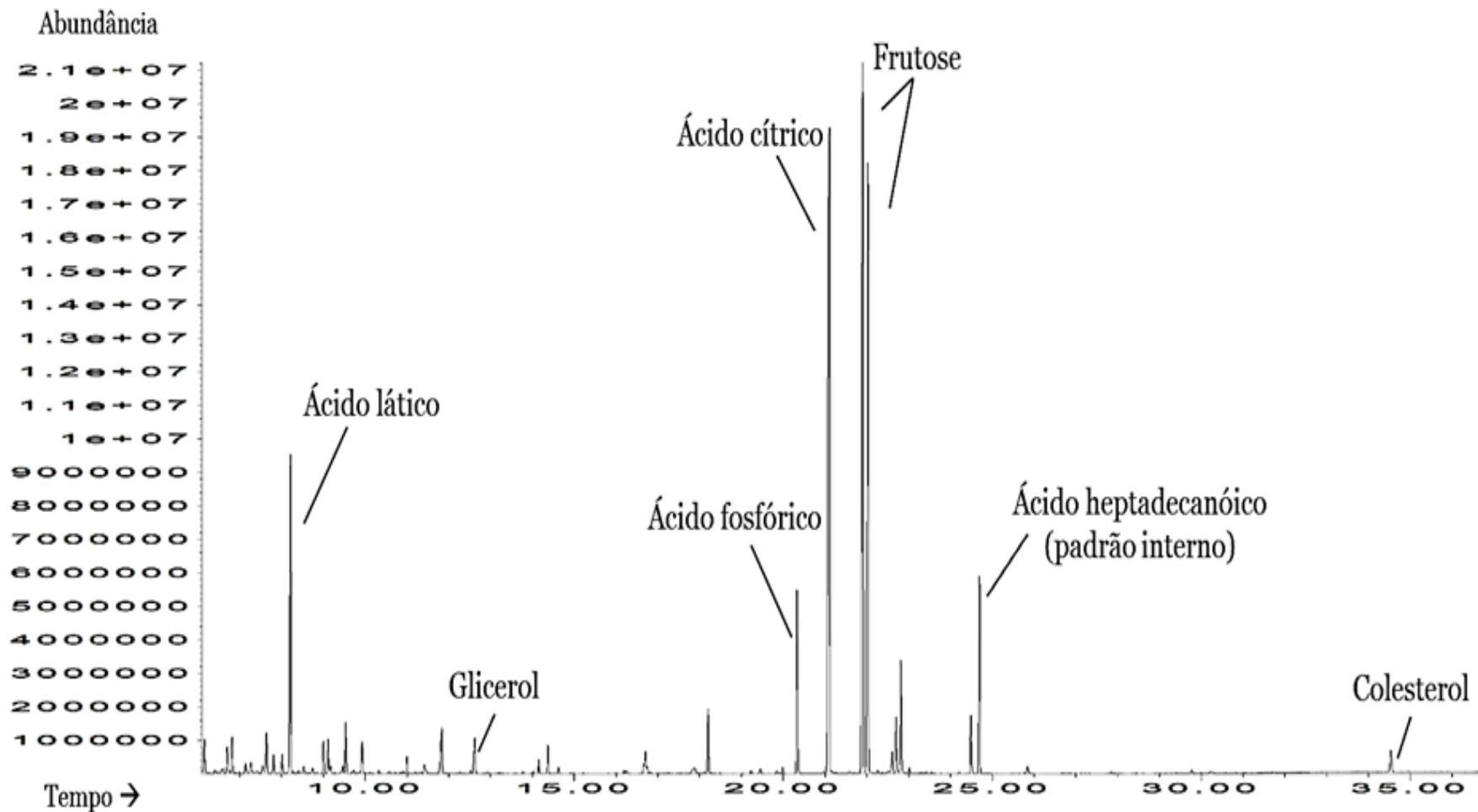


Figura 1. Cromatograma representativo de CG-EM do plasma seminal de touros. Os picos do ácido lático, glicerol, ácido fosfórico, ácido cítrico, frutose, ácido heptadecanóico (padrão interno) e colesterol são apresentados.

3.3.2 Classe química dos metabólitos

A classe química dos aminoácidos, peptídeos e análogos apresentou o maior número de metabólitos no plasma seminal bovino. Nessa classe, foram detectados 21 compostos, incluindo ácido glutâmico, alanina, isoleucina, leucina e serina, entre outros. O segundo maior grupo, com 20 metabólitos identificados, foi o dos compostos orgânicos, os quais constituíram o ácido cítrico, ácido láctico, ureia, ácido úrico e mio-inositol. Foram, também, identificados no plasma seminal dos touros, 12 carboidratos e seus conjugados, incluindo frutose, manitol, sorbitol, glicerol e ribitol. Além disso, foram detectados ácidos graxos e seus conjugados (ácido málico, ácido hexadecanóico, ácido metilmaleico e ácido esteárico); esteroides e seus derivados (androstenediona e colesterol); nucleosídeos, nucleotídeos e análogos (inosina e 5-metiluridina) e compostos inorgânicos (borato e ácido fosfórico) (Tabela 2 e Figura 2).

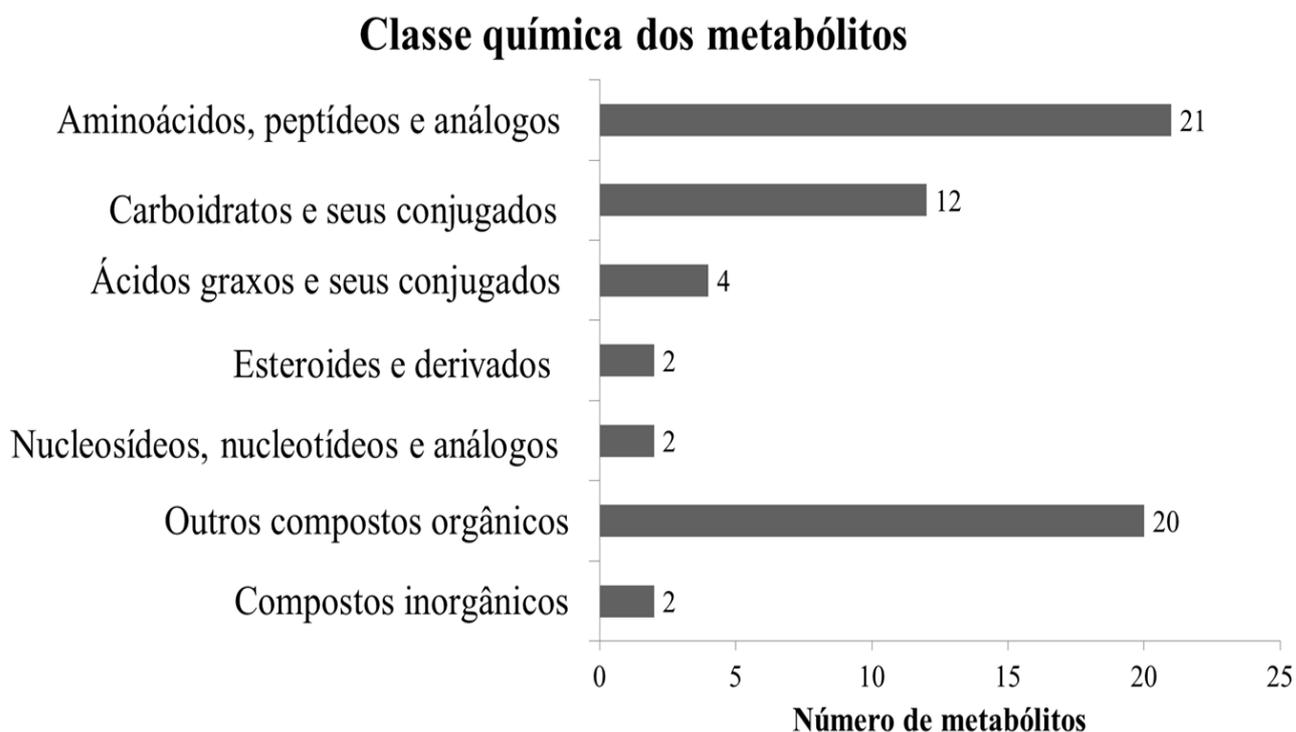


Figura 2. Número de metabólitos por classe química. Os metabólitos identificados foram categorizados de acordo com suas classes químicas, definidas como aminoácidos, peptídeos e análogos; carboidratos e seus conjugados; ácidos graxos e seus conjugados; esteroides e derivados; nucleosídeos, nucleotídeos e análogos; outros compostos orgânicos e compostos inorgânicos.

3.3.3 Metabólitos mais e menos predominantes do plasma seminal de touros

Com base nas razões de abundância, a frutose foi o metabólito mais predominante identificado no plasma seminal de todos os touros. Seguida pelo ácido cítrico, ácido láctico, ureia e ácido fosfórico (Figura 3A). No entanto, a androstenediona, 4-cetoglucose, D-xilofuanose, ácido 2-oxoglutárico e ácido eritrônico foram os cinco metabólitos menos predominantes encontrados no plasma seminal bovino (Figura 3B).

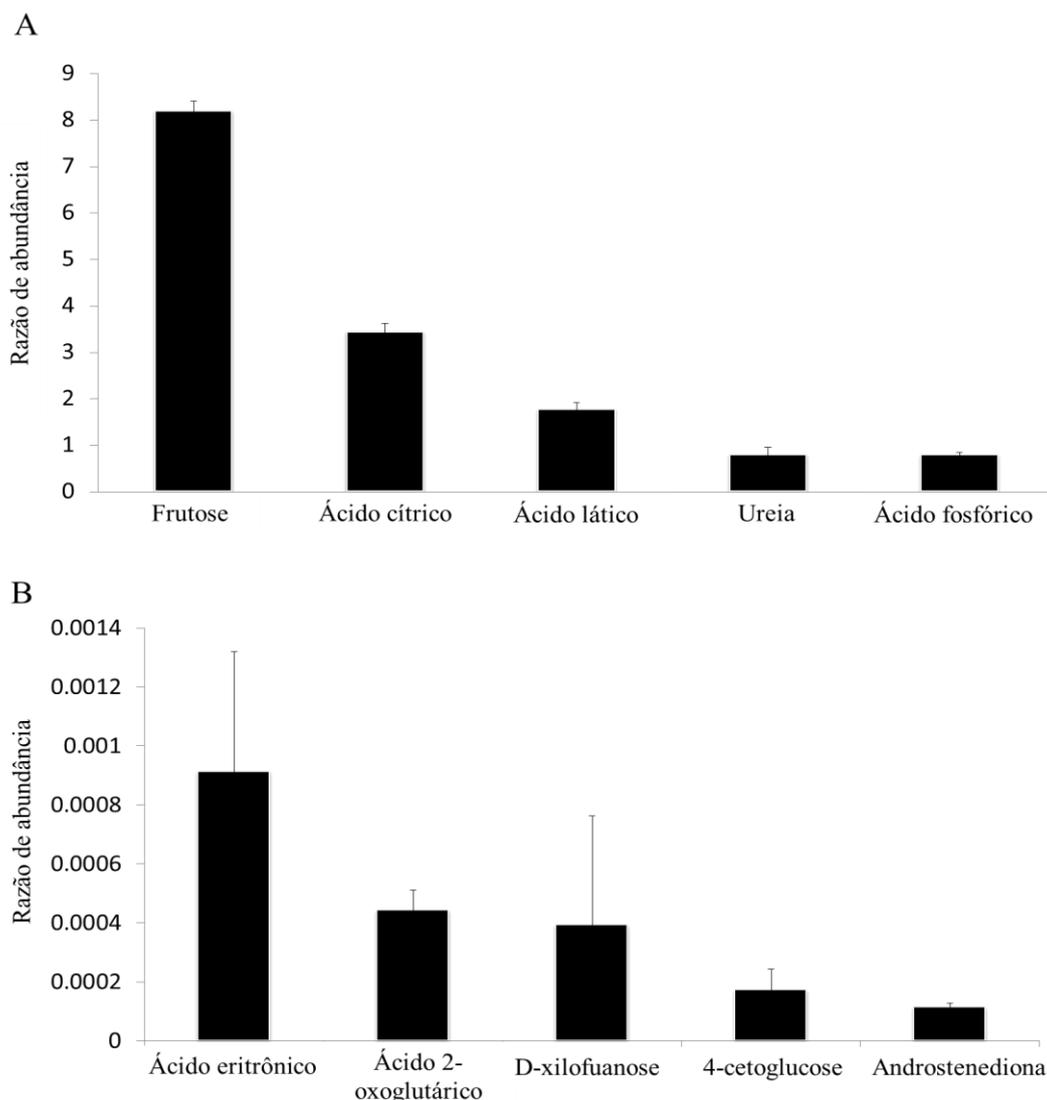


Figura 3. Razões de abundância dos metabólitos mais (A) e menos (B) abundantes identificados no plasma seminal de touros. A razão de abundância dos metabólitos foi calculada por meio da divisão das abundâncias dos íons alvo de cada metabólito pela abundância do padrão interno. As barras verticais representam o erro padrão da média.

3.3.4 Associações entre os metabólitos do plasma seminal e a fertilidade dos touros

A análise estatística multivariada do metaboloma do plasma seminal dos touros, realizada através da PLS-DA, indicou uma distinta separação entre os touros de alta e baixa fertilidade, conforme demonstrado pelo gráfico das pontuações (*scores plot*) do PLS-DA (Figura 4).

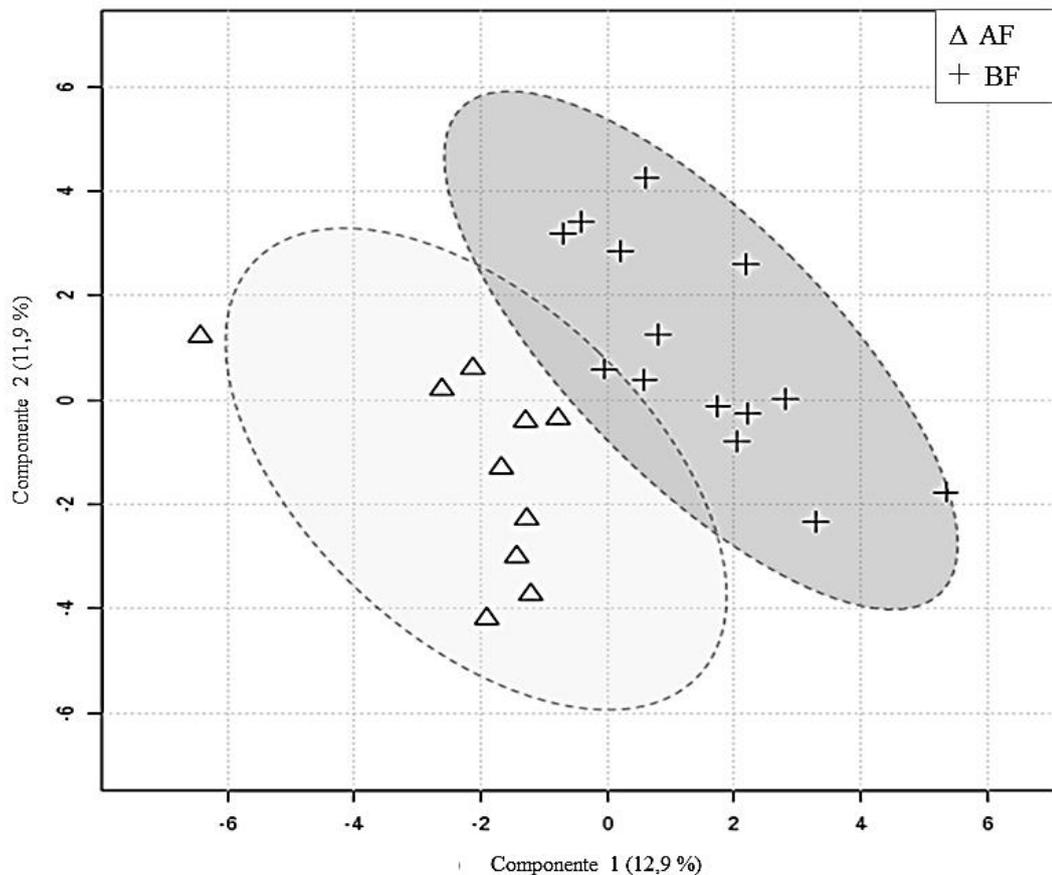


Figura 4. Gráfico das pontuações de PLS-DA do plasma seminal de touros de alta (Δ AF) e baixa (+ BF) fertilidade.

Os metabólitos com escore de VIP superior a 1,5 incluíram o ácido 2-oxoglutárico, frutose, ácido fosfórico, D-manitol, 4-cetoglucose, dulcitol e ácido eritrônico (Figura 5). Entre estes compostos, o ácido 2-oxoglutárico obteve o mais elevado escore de VIP (VIP = 2,17), seguido pela frutose (VIP = 2,1). O escore de VIP e o seu mapa de calor (*heatmap*) correspondente indicaram as concentrações mais elevadas ou as mais baixas de cada metabólito no plasma seminal dos touros de AF e BF. As concentrações do ácido 2-oxoglutárico, ácido

fosfórico, D-manitol e dulcitol foram menores nos touros de AF do que nos de BF. Contudo, a frutose, a 4-cetoglucose e o ácido eritrônico foram mais abundantes em touros de AF em comparação com os de BF.

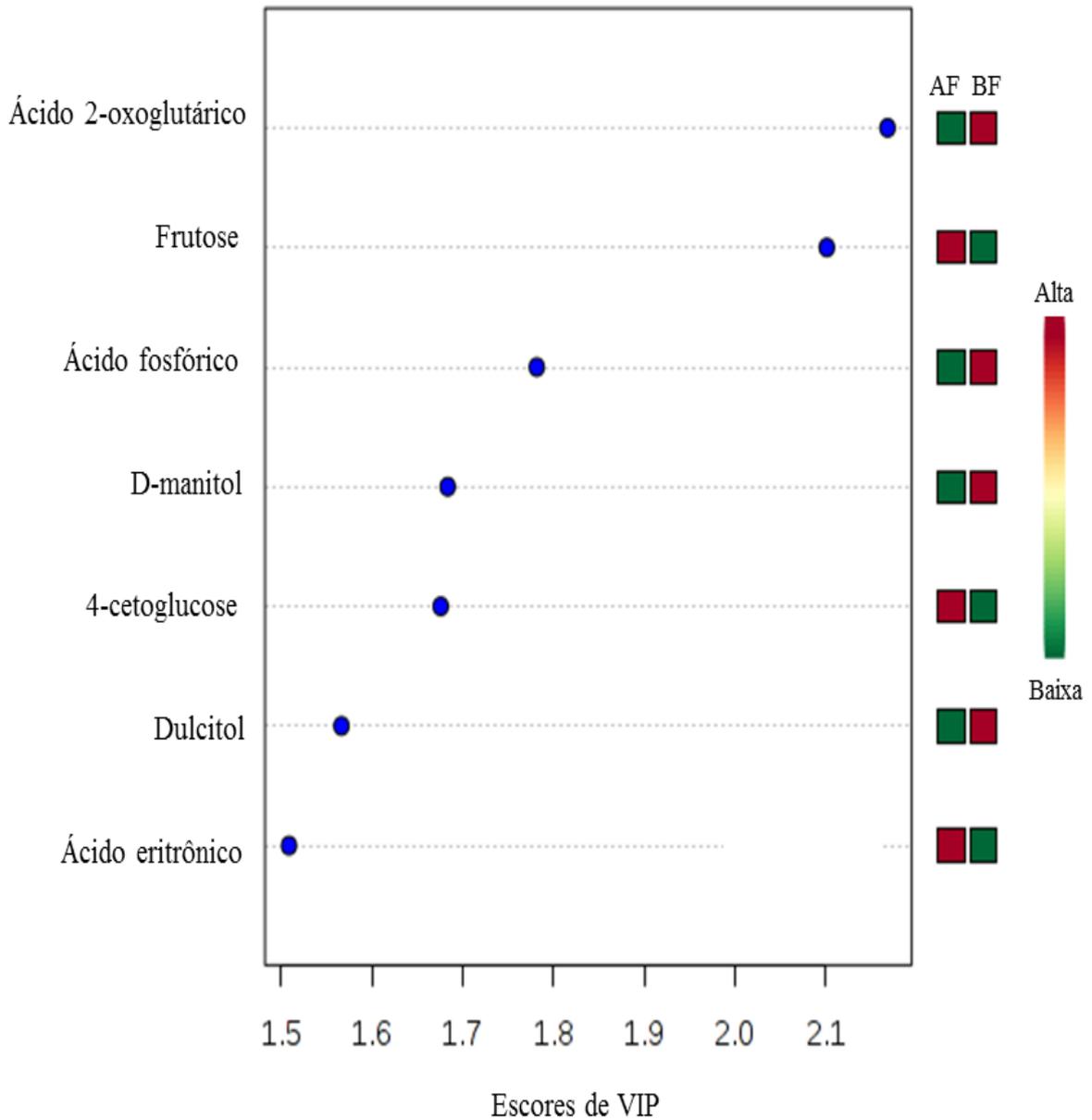


Figura 5. Escores de VIP dos metabólitos do plasma seminal de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF). Os metabólitos com VIP > 1,5 foram selecionados. O mapa de calor (*heatmap*) com os quadrados vermelhos e verdes indica a concentração alta ou baixa, respectivamente, do metabólito correspondente nos touros de AF e BF. A pontuação VIP foi baseada no modelo PLS-DA.

Com base na análise estatística univariada, as razões de abundância dos metabólitos ácido 2-oxoglutárico ($P = 0,02$), ornitina ($P = 0,03$), L-leucina ($P = 0,04$) e D-manitol ($P = 0,04$) foram menores em touros de AF do que em touros de BF. Enquanto que a razão de abundância da frutose foi maior ($P = 0,02$) em bovinos de AF, quando comparada com os de BF (Figura 6).

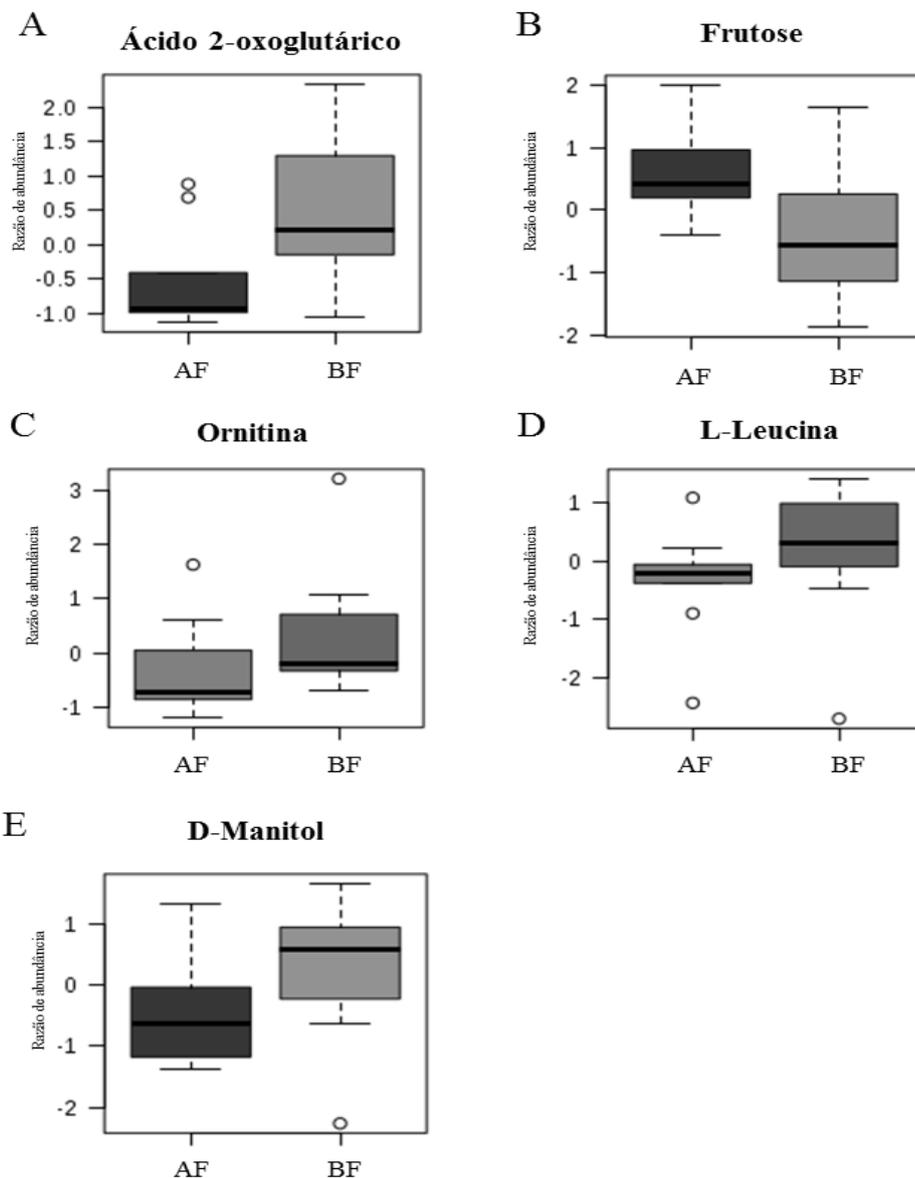


Figura 6. Gráficos de *box plot* das razões de abundância dos metabólitos ácido 2-oxoglutárico (A), frutose (B), ornitina (C), L-leucina (D) e D-manitol (E), identificados no plasma seminal de touros e que foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os touros de alta (AF) e baixa (BF) fertilidade.

A frutose foi correlacionada positivamente com os compostos amino-butirolactona ($r = 0,55$, $P = 0,005$), ácido oxálico ($r = 0,69$, $P < 0,0005$) e ácido fumárico ($r = 0,57$; $P < 0,005$) e inversamente associado com o p- tolil- Beta-D-glucuronida ($r = -0,51$; $P = 0,01$), ácido láctico ($r = -0,54$; $P = 0,006$), ureia ($r = -0,52$; $P = 0,009$), ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico ($r = -0,51$; $P = 0,001$), ácido glutâmico ($r = -0,53$; $P = 0,008$), ácido fosfórico ($r = -0,54$; $P = 0,007$) e D-glicero-D-gulo- heptose ($r = -0,56$; $P = 0,004$) (Figura 7).

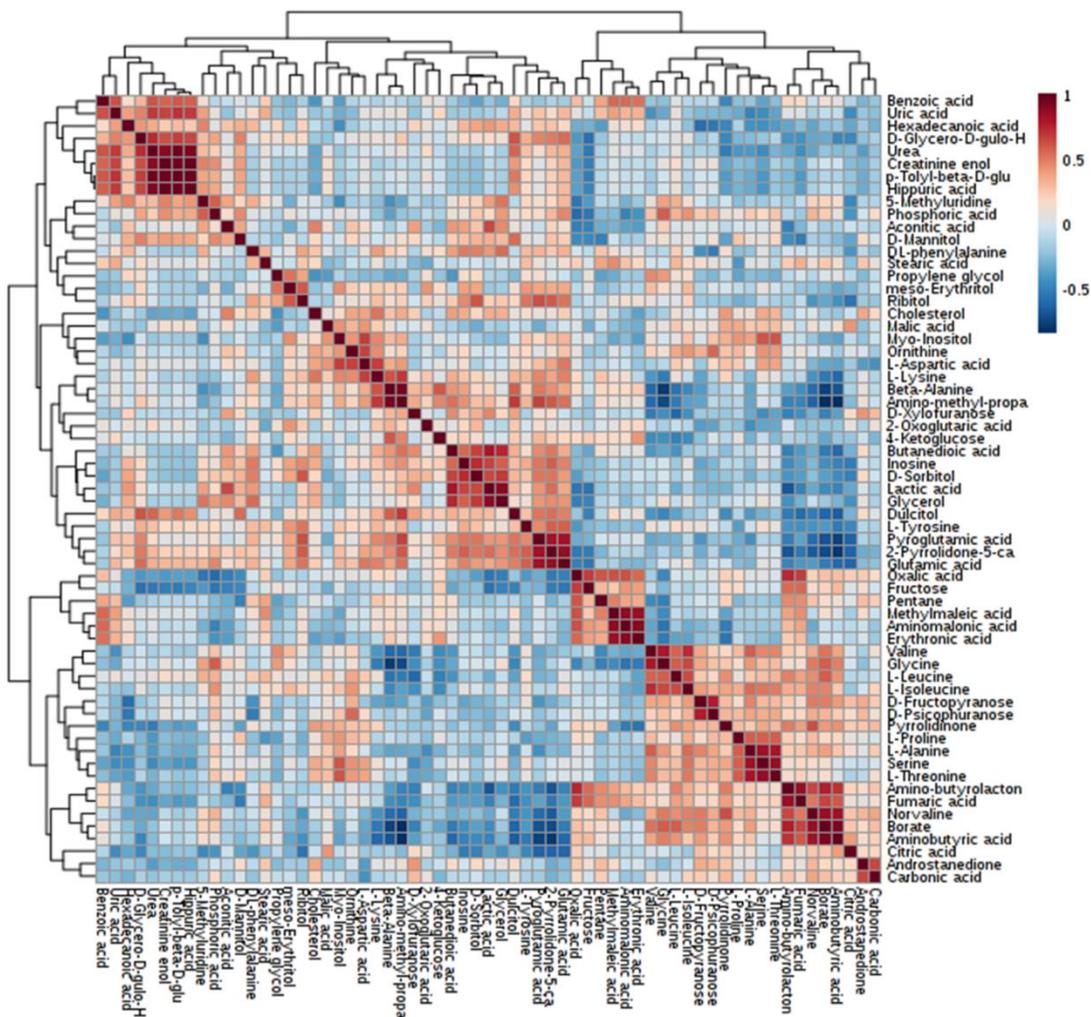


Figura 7. Mapa de calor da correlação de *Pearson* entre os metabólitos identificados no plasma seminal de touros. O mapa de calor (*heatmap*) com os quadrados vermelho escuro e azul escuro indica uma alta correlação positiva e uma alta correlação negativa, respectivamente, entre os metabólitos identificados.

3.3.5 Redes metabólicas dos metabólitos do plasma seminal de touros

As redes metabólicas foram determinadas para a frutose, ácido cítrico, ácido láctico e ureia, os quais foram os metabólitos mais abundantes encontrados no plasma seminal dos touros, bem como para o ácido 2-oxoglutárico, que foi o metabólito com maior escore de VIP. Baseado na rede metabólica da frutose (Figura 8A), o D-sorbitol sofre uma reação reversível para produzir frutose, a qual é convertida em beta-D-frutose-6-fosfato e D-frutose-1-fosfato. O ácido cítrico pode ser convertido e reconvertido em cis-aconitato, isocitrato, acetato e oxaloacetato. Em seguida, reações não reversíveis produzem acetil-CoA e oxaloacetato (Figura 8B). O ácido láctico é sintetizado a partir do S-lactoilglutaciona ou piruvato através de uma reação não reversível e uma reversível, respectivamente (Figura 8C). A ureia pode ser produzida a partir da L-arginina e do alantoato, os quais são convertidos em ureia e ureidoglicolato. A L-arginina pode ser hidrolisada em ureia e ornitina (Figura 8D). O ácido 2-oxoglutárico está envolvido em diversas reações reversíveis e não reversíveis, uma vez que ele pode ser sintetizado a partir do L-glutamato, succinil-CoA, 2-hidroxicitarato, 2-metil-3-oxopropanoato e 3-amino-2-metilpropanoato, entre outros. Ao mesmo tempo, ele pode ainda ser convertido em 3-carboxi-1-hidroxi-3-piruvato, succinato e peptídeo-3-hidroxi-L-aspartato (Figura 8E).

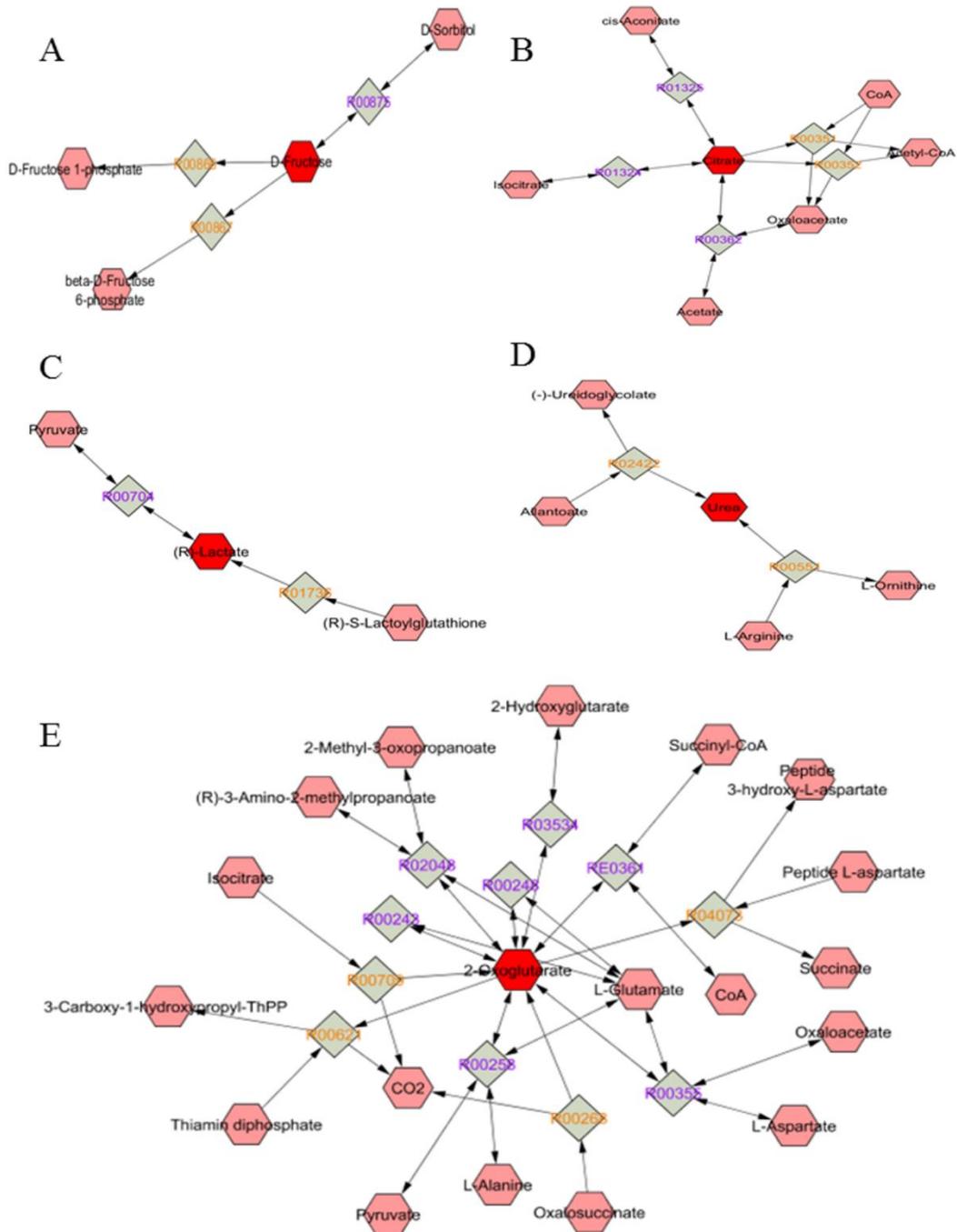


Figura 8. Redes metabólicas dos metabólitos frutose (A), ácido cítrico (B), ácido láctico (C), ureia (D) e ácido 2-oxoglutárico (E), identificados no plasma seminal de touros: As redes metabólicas foram geradas usando o *Metscape*, versão 3.1.2, um *plug-in* do programa *Cytoscape*, versão 3.2.1 (<http://www.cytoscape.org>). Os metabólitos inseridos no programa são mostrados em hexágonos vermelhos. Os compostos gerados pelo programa são representados como hexágonos cor-de-rosa, as reações reversíveis, como quadrados cinza com texto roxo e, as reações não reversíveis, como quadrados cinza com texto laranja.

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós realizamos análises utilizando a técnica de CG-EM para avaliar o metaboloma do plasma seminal de touros e identificar potenciais biomarcadores de fertilidade. Adicionalmente, nós utilizamos ferramentas de bioinformáticas para identificar interações e reações, as quais os metabólitos do plasma seminal desses animais estão envolvidos. Apesar de um estudo anterior ter investigado a composição de aminoácidos e de ácidos graxos no plasma seminal bovino por meio de CG-EM (HOLDEN et al., 2017), o presente estudo é, de fato, o primeiro a realizar uma avaliação mais abrangente do metaboloma do plasma seminal bovino, o qual incluiu não só a identificação de aminoácidos e ácidos graxos, mas também carboidratos, nucleosídeos, esteróides, compostos orgânicos e inorgânicos por CG-EM. Além disso, descrevemos a associação desses metabólitos específicos do plasma seminal com os escores de fertilidade de touros mensurados *in vivo*.

Os metabólitos são produtos de reações metabólicas, apresentando-se em inúmeras vias bioquímicas (DUNN et al., 2011), adicionalmente eles têm sido relatados como potenciais biomarcadores de fertilidade masculina (DEEPINDER et al., 2007; KOVAC et al., 2013). Deste modo, pequenas moléculas, tais como: aminoácidos, peptídeos, carboidratos, ácidos graxos, esteróides e nucleosídeos, entre outras, estão relacionados a importantes fatores associados ao bom funcionamento da fisiologia espermática, incluindo a motilidade, a proteção da membrana e o controle do pH (KAMP; LAUTERWEIN, 1995; DEEPINDER et al., 2007; GILANY et al., 2014; KUMAR et al., 2015). Como mostrado no presente estudo, após as análises por CG-EM, as principais classes químicas do plasma seminal bovino foram definidas como aminoácidos, peptídeos e análogos, seguidos por outros compostos orgânicos e pelos carboidratos e carboidratos conjugados.

No presente estudo, foram identificados 21 metabólitos descritos como aminoácidos, peptídeos e análogos no plasma seminal bovino. Similarmente, em um estudo anterior foram detectados 20 aminoácidos (AL-HAKIM et al., 1970) e em um recente estudo foram identificados 23 aminoácidos (HOLDEN et al., 2017) no plasma seminal de touros utilizando a técnica CG-EM. Outros estudos relataram a presença de um elevado número de aminoácidos nos espermatozoides humanos (PAIVA et al., 2015) e no fluido epididimário de caprinos (PATEL et al., 1999). Sabe-se que além de desempenhar um papel essencial como constituinte básico das proteínas presentes nos espermatozoides (PAPP et al., 1983), os aminoácidos participam em eventos fisiologicamente importantes para as células espermáticas, incluindo

proteção e regulação das suas atividades metabólicas (PATEL et al., 1999). Além disso, têm sido sugerido que os aminoácidos protegem os espermatozoides ovinos durante a criopreservação, diminuindo a peroxidação lipídica e atuando contra lesões causadas pelos radicais livres (SANGEETA et al., 2015).

Já a presença de carboidratos no plasma seminal de mamíferos é uma fonte essencial de energia para as células espermáticas, pois estas moléculas fazem parte de diversas vias de produção de energia (GRAVES; SALISBURY, 1966; WILLIAMS; FORD, 2001; JUYENA; STELLETTA, 2012). Uma delas é a via da glicólise, a qual os espermatozoides de mamíferos usam para obter energia. Nesta via, os carboidratos presentes no plasma seminal, entre eles a frutose, são necessários para a geração de trifosfato de adenosina (ATP), o que leva ao aumento da atividade respiratória dos espermatozoides, um evento importante para dar suporte a ótima motilidade e sobrevivência dessas células (MANN, 1946; MUKAI; OKUNO, 2004; FORD, 2006).

Nossos resultados mostraram que os metabólitos mais predominantes detectados no plasma seminal dos touros foram a frutose, o ácido cítrico, o ácido láctico, a ureia e o ácido fosfórico, enquanto a androstenediona, a 4-cetoglucose, a D-xilofuranose, o ácido 2-oxoglutárico e o ácido eritrônico foram os menos abundantes. A análise estatística multivariada mostrou que a frutose contribuiu para a separação dos grupos e ela foi o metabólito com o segundo maior escore de VIP. Adicionalmente, a concentração de frutose foi significativamente maior em touros de alta fertilidade do que em animais de baixa fertilidade. Corroborando com estes achados, os estudos têm mostrado que a frutose é a principal fonte de energia para os espermatozoides de touros e, também, é o principal carboidrato presente no plasma seminal desses animais (MANN, 1946; KING; MANN, 1959; OEFNER et al., 1985; LIBERDA et al., 2001).

A frutose é um metabólito produzido nas vesículas seminais através de estimulação androgênica (KUMAR; FAROOQ, 1994; JUYENA; STELLETTA, 2012) e, além dela ser encontrada no plasma seminal de touros, ela tem sido observada no fluido seminal de outras espécies, incluindo búfalos (ANAND, 1973), caprinos (ANAND, 1973; MENDOZA et al., 1989), ovinos (MATSUOKA et al., 2006), javalis (BARONOS, 1971) humanos (LEWIS-JONES et al., 1996; ZÖPFGEN et al., 2000; JAYARAMAN et al., 2014) e coelhos (YOUSEF et al., 2005). Conforme revelado pelas nossas análises *in silico*, a frutose está envolvida em vias metabólicas fundamentais para a produção de energia para os espermatozoides. Uma delas, é a via em que a frutose é produzida a partir do sorbitol, presente na membrana das células

espermáticas, por meio de uma reação catalisada pela enzima sorbitol desidrogenase. Nesta via, logo após a sua produção, a frutose entra na célula e é, então, convertida em beta-D-frutose-6-fosfato e frutose 1-fosfato (KING; MANN, 1959; CAO et al., 2009). A frutose pode, ainda, ser metabolizada em ácido láctico, que é conhecida como a via da frutólise, a qual é dependente de alguns fatores, como pH e temperatura (MANN, 1946; KING; MANN, 1959).

Estudos anteriores relataram que foram encontrados menores níveis de frutose no plasma seminal de homens inférteis idiopáticos, azoospermicos e oligozoospermico em comparação aos níveis presentes no plasma seminal de homens férteis (JAYARAMAN et al., 2014). Yousef et al. (2005) sugeriram, ainda, que a diminuição nos níveis de frutose no plasma seminal de coelhos intoxicados com cloreto de alumínio pode ter sido um dos fatores para a redução da motilidade espermática observada nesses animais. Assim sendo, como a frutose é uma importante fonte de energia para os espermatozoides, baixos níveis deste metabólito no plasma seminal de touros poderiam reduzir o suprimento de energia para essas células, afetando o metabolismo das mesmas e conseqüentemente comprometendo a fertilidade desses animais.

Como observado no plasma seminal de touros, o ácido cítrico também é encontrado no sêmen de outras espécies de mamíferos, tais como javali (BOURSNELL et al., 1972; KAMP; LAUTERWEIN, 1995), homem (HAMAMAH et al., 1993; JAYARAMAN et al., 2014) e coelho (WILLIAMS et al., 1990). O ácido cítrico é um metabólito que ajuda a controlar o pH do sêmen de javalis e desempenha um papel importante como uma molécula quelante de zinco, magnésio e cálcio (KAMP; LAUTERWEIN, 1995). As concentrações de zinco, magnésio e cálcio no plasma seminal humano e de seus quelantes podem influenciar o metabolismo do espermatozoide, afetando o transporte, a reação acrossômica e a fertilização dessas células (SØRENSEN et al., 1999). Um estudo anterior demonstrou que a presença de ácido cítrico no plasma seminal está associada à fertilidade dos touros, tendo potenciais efeitos sobre a capacitação espermática e reação acrossômica (KUMAR et al., 2015). O ácido láctico, assim como a frutose e o ácido cítrico, é usado como outra importante fonte de energia para as células espermáticas (PAVENTI et al., 2015) e níveis baixos de ácido láctico foram detectados em espermatozoides de touro com baixa viabilidade (DILLS et al., 1981).

Como mostrado no presente estudo, nós ainda detectamos níveis elevados de ureia e de ácido fosfórico no plasma seminal dos touros. A ureia também já foi encontrada no fluido seminal humano (SRIVASTAVA et al., 1984), entretanto o papel que ela desempenha no sêmen ainda é desconhecido. Uma vez que a ureia é um produto final do metabolismo das proteínas (NEWAIRY et al., 2009) e que o líquido seminal tem elevados níveis de proteína, é possível

que a ureia, presente no fluido seminal, seja um produto da degradação proteica. No presente estudo foi observado, também, que o ácido fosfórico apresentou o terceiro maior escore de VIP, o que mostrou a associação deste metabólito com os menores escores de fertilidade dos touros. Nos espermatozoides, o ácido fosfórico pode ser um produto de uma reação catalisada pela enzima pirofosfatase inorgânica (PPA1). A PPA1 catalisa a hidrólise de uma molécula de pirofosfato inorgânico (PPi) para que ocorra a produção de duas moléculas de ácido fosfórico, levando à liberação de energia. O transporte do PPi dos espermatozoides para o plasma seminal pode ser regulado por uma proteína transmembrana, chamada proteína de anquilose progressiva (ANKH). Assim sendo, a energia produzida a partir da conversão de PPi em ácido fosfórico poderia ser utilizada para a motilidade espermática e, também, durante a fertilização (YI et al., 2012).

No presente estudo, o propileno glicol foi identificado no plasma seminal de touros e este resultado está de acordo com estudos anteriores, os quais mostraram que o propileno glicol está presente no espermatozoide humano (PAIVA et al., 2015), soro sanguíneo (PSYCHOGIOS et al., 2011) e urina (BOUATRA et al., 2013). Além disso, o propileno glicol, uma molécula sintética, é encontrado em produtos farmacêuticos e em alimentos que são rotineiramente utilizados para a alimentação animal, podendo ser usado como aditivo alimentar para o gado leiteiro (NIELSEN; INGVARTSEN, 2004). Assim sendo, nós acreditamos que a presença do propileno glicol no plasma seminal de touros não é resultado de uma contaminação, uma vez que este metabólito já foi, anteriormente, detectado em células e secreções humanas. No entanto, é possível que o propileno glicol derive, originalmente, de alimentos, o que também pode ser a razão pela qual ele tenha sido identificado tanto em amostras humanas, como animais.

O componente identificado como ácido 2-oxoglutárico foi um dos metabólitos menos abundantes presente no plasma seminal dos touros, mas apresentou o maior escore de VIP, sendo encontrado em menores níveis nos fluidos seminais de touros de alta fertilidade em comparação com os touros de baixa fertilidade. Corroborando com os nossos resultados, um estudo anterior relatou que o ácido 2-oxoglutárico foi encontrado em níveis mais elevados no plasma seminal de pacientes com astenozoospermia quando comparados com os níveis desse metabólito em homens saudáveis (ZHANG et al., 2015). Sabe-se que o ácido 2-oxoglutárico pode ser sintetizado a partir do glutamato pela ação da enzima 2-oxoglutarato aminotransferase (LI et al., 2014), como, também, foi observado após a análise *in silico* realizada no presente estudo. No sêmen de javalis, a 2-oxoglutarato aminotransferase foi detectada principalmente

nos espermatozoides (VAN DER HORST, 1970) e, essa enzima foi liberada no meio extracelular em níveis mais altos pelas células espermáticas de javalis com baixa viabilidade, após o congelamento do sêmen (MOORE; HIBBITT, 1977). Outros estudos têm proposto que a alta atividade da 2-oxoglutarato aminotransferase no plasma seminal e sua liberação aumentada no fluido extracelular são indicadores de lesão da membrana espermática e baixa qualidade do sêmen em caprinos e touros (GRAHAM; PACE, 1967; VAN DER HORST et al., 1979; TULI; HOLTZ, 1994). Assim sendo, todos esses achados poderiam explicar a ocorrência de maiores concentrações do ácido 2-oxoglutárico no plasma seminal de bovinos de baixa fertilidade observada no presente estudo.

Em contraste com as investigações que demonstram que o ácido 2-oxoglutárico e a 2-oxoglutarato aminotransferase estão associados à baixa qualidade reprodutiva de homens, caprinos e touros, um estudo relatou que a incubação *in vitro* de espermatozoides de ratos com o ácido 2-oxoglutárico protege essas células contra o estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LI et al., 2010). Embora esses autores tenham sugerido que o ácido 2-oxoglutárico possui atividade antioxidante, as comparações de tais resultados com os nossos devem ser feitas com cautela, uma vez que no estudo de Li et al. (2010), os espermatozoides de ratos foram incubados simultaneamente com H_2O_2 e ácido 2-oxoglutárico, em condições totalmente controladas. Além disso, o experimento foi conduzido com espermatozoides epididimários, os quais apresentam tanto atividades funcionais, quanto metabólicas significativamente diferentes daquelas observadas em espermatozoides ejaculados.

3.5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que a frutose, o ácido cítrico, o ácido láctico, a ureia e o ácido fosfórico são os metabólitos mais abundantes do plasma seminal de touros. Adicionalmente, foi detectada a separação dos perfis metabolômicos entre os touros de alta e de baixa fertilidade e foi determinado que a frutose e o ácido 2-oxoglutárico são candidatos a biomarcadores de fertilidade de touros. Desta forma, os achados do nosso estudo ajudarão a melhorar a compreensão atual dos processos multifatoriais e complexos que envolvem a fisiologia da fertilidade masculina.

REFERÊNCIAS

- AL-HAKIM, M. K.; GRAHAM, E. F.; SCHMEHL, M. L. Free amino acids and amino compounds in bovine seminal plasma. **J Dairy Sci**, v. 53, n. 1, p. 84-8, 1970.
- ANAND, S. R. The carbohydrates of buffalo and goat semen. **J Reprod Fertil**, v. 32, n. 1, p. 97-100, 1973.
- BARONOS, S. Seminal carbohydrate in boar and stallion. **J Reprod Fertil**, v. 24, n. 2, p. 303-5, 1971.
- BOUATRA, S.; AZIAT, F.; MANDAL, R.; GUO, A. C.; WILSON, M. R.; KNOX, C.; BJORND AHL, T. C.; KRISHNAMURTHY, R.; SALEEM, F.; LIU, P.; DAME, Z. T.; POELZER, J.; HUYNH, J.; YALLOU, F. S.; PSYCHOGIOS, N.; DONG, E.; BOGUMIL, R.; ROEHRING, C.; WISHART, D. S. The human urine metabolome. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73076, 2013.
- BOURSNELL, J. C.; BARONOS, S.; BRIGGS, P. A.; BUTLER, E. J. The concentrations of zinc in boar seminal plasma and vesicular secretion in relation to those of nitrogenous substances, citrate, galactose and fructose. **J Reprod Fertil**, v. 29, n. 2, p. 215-27, 1972.
- BRAHMKSHTRI, B. P.; EDWIN, M. J.; JOHN, M. C.; NAINAR, A. M.; KRISHNAN, A. R. Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. **Anim Reprod Sci**, v. 54, n. 3, p. 159-68, 1999.
- BROMFIELD, J. J. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. **Reproduction**, v. 152, n. 6, p. R223-R232, 2016.
- CAO, W.; AGHAJANIAN, H. K.; HAIG-LADEWIG, L. A.; GERTON, G. L. Sorbitol can fuel mouse sperm motility and protein tyrosine phosphorylation via sorbitol dehydrogenase. **Biol Reprod**, v. 80, n. 1, p. 124-33, 2009.
- CHANG, Y.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G. Effects of trait definition on genetic parameter estimates and sire evaluation for clinical mastitis with threshold models. **Animal Science**, v. 79, p. 355-363, 2004.
- CHENOWETH, P. J. Influence of the male on embryo quality. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 308-15, 2007.
- DE OLIVEIRA, R. V.; DOGAN, S.; BELSER, L. E.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A.; THIBAudeau, G.; MEMILI, E. Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. **Reproduction**, v. 146, n. 3, p. 263-72, 2013.
- DEEPINDER, F.; CHOWDARY, H. T.; AGARWAL, A. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 7, n. 4, p. 351-8, 2007.

DILLS, W. L.; BELL, L. S.; ONUMA, E. K. Inhibitory effects of substrate analogs on lactate production from fructose and glucose in bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 25, n. 3, p. 458-65, 1981.

DUNN, W. B.; BAILEY, N. J.; JOHNSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **Analyst**, v. 130, n. 5, p. 606-25, 2005.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 1, p. 387-426, 2011.

FERLIN, A.; FORESTA, C. New genetic markers for male infertility. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 26, n. 3, p. 193-8, 2014.

FEUGANG, J. M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G. C.; TOPPER, E. K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reprod Biomed Online**, v. 21, n. 3, p. 312-24, 2010.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comp Funct Genomics**, v. 2, n. 3, p. 155-68, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol Biol**, v. 48, n. 1-2, p. 155-71, 2002.

FORD, W. C. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 3, p. 269-74, 2006.

GILANY, K.; MOAZENI-POURASIL, R. S.; JAFARZADEH, N.; SAVADI-SHIRAZ, E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. **Mol Reprod Dev**, v. 81, n. 1, p. 84-6, 2014.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 5, p. 245-52, 2004.

GOODSON, S. G.; QIU, Y.; SUTTON, K. A.; XIE, G.; JIA, W.; O'BRIEN, D. A. Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. **Biol Reprod**, v. 87, n. 3, p. 75, 2012.

GRAHAM, E. F.; PACE, M. M. Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. **Cryobiology**, v. 4, n. 2, p. 75-84, 1967.

GRAVES, C. N.; SALISBURY, G. W. The metabolism of carbohydrates and other compounds by epididymal-like bovine spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 12, n. 1, p. 213-5, 1966.

HAMAMAH, S.; SEGUIN, F.; BARTHELEMY, C.; AKOKA, S.; LE PAPE, A.; LANSAC, J.; ROYERE, D. ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. **J Reprod Fertil**, v. 97, n. 1, p. 51-5, 1993.

HAMAMAH, S.; SEGUIN, F.; BUJAN, L.; BARTHELEMY, C.; MIEUSSET, R.; LANSAC, J. Quantification by magnetic resonance spectroscopy of metabolites in seminal plasma able to differentiate different forms of azoospermia. **Hum Reprod**, v. 13, n. 1, p. 132-5, 1998.

HOLDEN, S. A.; FERNANDEZ-FUERTES, B.; MURPHY, C.; WHELAN, H.; O'GORMAN, A.; BRENNAN, L.; BUTLER, S. T.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. **Theriogenology**, v. 87, p. 221-228, 2017.

HOLLYWOOD, K.; BRISON, D. R.; GOODACRE, R. Metabolomics: current technologies and future trends. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4716-23, 2006.

HOLROYD, R. G.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; VANKAN, D. M.; FITZPATRICK, L. A.; JAYAWARDHANA, G. A.; MILLER, R. G. Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 67-79, 2002.

JAYARAMAN, V.; GHOSH, S.; SENGUPTA, A.; SRIVASTAVA, S.; SONAWAT, H. M.; NARAYAN, P. K. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 9, p. 1195-204, 2014.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **J Androl**, v. 33, n. 4, p. 536-51, 2012.

KAMP, G.; LAUTERWEIN, J. Multinuclear magnetic resonance studies of boar seminal plasma. **Biochim Biophys Acta**, v. 1243, n. 1, p. 101-9, 1995.

KARNOVSKY, A.; WEYMOUTH, T.; HULL, T.; TARCEA, V. G.; SCARDONI, G.; LAUDANNA, C.; SARTOR, M. A.; STRINGER, K. A.; JAGADISH, H. V.; BURANT, C.; ATHEY, B.; OMENN, G. S. Metscape 2 bioinformatics tool for the analysis and visualization of metabolomics and gene expression data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 3, p. 373-80, 2012.

KING, T. E.; MANN, T. Sorbitol metabolism in spermatozoa. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 151, p. 226-246, 1959.

KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; LAMB, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 998-1007, 2013.

KUMAR, A.; FAROOQ, A. Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. **Life Sci**, v. 55, n. 1, p. PL19-24, 1994.

- KUMAR, A.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P.; ANZAR, M. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: ¹H nuclear magnetic resonance analysis. **Mol Reprod Dev**, v. 82, n. 2, p. 123-31, 2015.
- LEWIS-JONES, D. I.; AIRD, I. A.; BILJAN, M. M.; KINGSLAND, C. R. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. **Hum Reprod**, v. 11, n. 11, p. 2465-7, 1996.
- LI, S. F.; LIU, H. X.; ZHANG, Y. B.; YAN, Y. C.; LI, Y. P. The protective effects of alpha-ketoacids against oxidative stress on rat spermatozoa in vitro. **Asian J Androl**, v. 12, n. 2, p. 247-56, 2010.
- LI, Y.; HOU, X.; QI, Q.; WANG, L.; LUO, L.; YANG, S.; ZHANG, Y.; MIAO, Z.; WANG, F.; WANG, H.; HUANG, W.; WANG, Z.; SHEN, Y.; WANG, Y. Scavenging of blood glutamate for enhancing brain-to-blood glutamate efflux. **Mol Med Rep**, v. 9, n. 1, p. 305-10, 2014.
- LIBERDA, J.; KRAUS, M.; RYSLAVÁ, H.; VLASÁKOVÁ, M.; JONÁKOVÁ, V.; TICHÁ, M. D-fructose-binding proteins in bull seminal plasma: isolation and characterization. **Folia Biol (Praha)**, v. 47, n. 4, p. 113-9, 2001.
- MANN, T. Fructose, a constituent of semen. **Nature**, v. 157, p. 79, 1946.
- MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. **Biochem J**, v. 40, n. 4, p. 481-91, 1946.
- MATSUOKA, T.; IMAI, H.; ASAKUMA, S.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. **J Reprod Dev**, v. 52, n. 6, p. 805-10, 2006.
- MENDOZA, G.; WHITE, I. G.; CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. **Theriogenology**, v. 32, n. 3, p. 455-66, 1989.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Anim Reprod Sci**, v. 105, n. 1-2, p. 104-18, 2008.
- MOORE, H. D.; HIBBITT, K. G. Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. **J Reprod Fertil**, v. 50, n. 2, p. 349-52, 1977.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 2, p. 214-22, 2007.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **J Androl**, v. 27, n. 4, p. 534-41, 2006.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biol Reprod**, v. 71, n. 2, p. 540-7, 2004.

MUÑOZ, M.; UYAR, A.; CORREIA, E.; DÍEZ, C.; FERNANDEZ-GONZALEZ, A.; CAAMAÑO, J. N.; TRIGAL, B.; CARROCERA, S.; SELI, E.; GOMEZ, E. Non-invasive assessment of embryonic sex in cattle by metabolic fingerprinting of in vitro culture medium. **Metabolomics**, v. 10, p. 443-451, 2014.

NEWAIRY, A. S.; SALAMA, A. F.; HUSSIEN, H. M.; YOUSEF, M. I. Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 6, p. 1093-8, 2009.

NIELSEN, N. I.; INGVARTSEN, K. L. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, n. 3-4, p. 191-213, 2004.

OEFNER, P.; BONN, G.; BARTSCH, G. High-performance liquid chromatographic analysis of citric acid, inositol and fructose in boar and bull seminal plasma. **Andrologia**, v. 17, n. 3, p. 250-3, 1985.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 9, p. 373-8, 1998.

PAIVA, C.; AMARAL, A.; RODRIGUEZ, M.; CANYELLAS, N.; CORREIG, X.; BALLESCA, J. L.; RAMALHO-SANTOS, J.; OLIVA, R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance ((1) H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology**, v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.

PAPP, G.; GRÓF, J.; MENYHÁRT, J. The role of basic amino acids of the seminal plasma in fertility. **Int Urol Nephrol**, v. 15, n. 2, p. 195-203, 1983.

PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **Vet J**, v. 168, n. 3, p. 215-29, 2004.

PATEL, A. B.; SRIVASTAVA, S.; PHADKE, R. S.; GOVIL, G. Identification of low-molecular-weight compounds in goat epididymis using multinuclear nuclear magnetic resonance. **Anal Biochem**, v. 266, n. 2, p. 205-15, 1999.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 263-9, 2012.

PAVENTI, G.; LESSARD, C.; BAILEY, J. L.; PASSARELLA, S. In boar sperm capacitation L-lactate and succinate, but not pyruvate and citrate, contribute to the mitochondrial membrane potential increase as monitored via safranin O fluorescence. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 462, n. 3, p. 257-62, 2015.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Syst Biol**, v. 2, p. 19, 2008.

PETHERICK, J. A review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle, and individual bull and herd fertility. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 90, p. 185-205, 2005.

PSYCHOGIOS, N.; HAU, D. D.; PENG, J.; GUO, A. C.; MANDAL, R.; BOUATRA, S.; SINELNIKOV, I.; KRISHNAMURTHY, R.; EISNER, R.; GAUTAM, B.; YOUNG, N.; XIA, J.; KNOX, C.; DONG, E.; HUANG, P.; HOLLANDER, Z.; PEDERSEN, T. L.; SMITH, S. R.; BAMFORTH, F.; GREINER, R.; MCMANUS, B.; NEWMAN, J. W.; GOODFRIEND, T.; WISHART, D. S. The human serum metabolome. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16957, 2011.

REGO, J. P.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; BURNS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 148, n. 1-2, p. 1-17, 2014.

REGO, J. P.; MARTINS, J. M.; WOLF, C. A.; VAN TILBURG, M.; MORENO, F.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; SANTOS, D. O.; MOURA, A. A. Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzerat bulls. **J Anim Sci**, v. 94, n. 12, p. 5308-5320, 2016.

SANGEETA, S.; ARANGASAMY, A.; KULKARNI, S.; SELVARAJU, S. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. **Anim Reprod Sci**, v. 161, p. 82-8, 2015.

SELI, E.; ROBERT, C.; SIRARD, M. A. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 8, p. 513-30, 2010.

SHI, S.; YI, L.; YUN, Y.; ZHANG, X.; LIANG, Y. A combination of GC-MS and chemometrics reveals metabolic differences between serum and plasma. **Analytical Methods**, v. 7, p. 1751-1757, 2015.

SØRENSEN, M. B.; BERGDAHL, I. A.; HJØLLUND, N. H.; BONDE, J. P.; STOLTENBERG, M.; ERNST, E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 4, p. 331-7, 1999.

SRIVASTAVA, A.; CHOPRA, S. K.; DASGUPTA, P. R. Biochemical analysis of human seminal plasma. II. Protein, non-protein nitrogen, urea, uric acid and creatine. **Andrologia**, v. 16, n. 3, p. 265-8, 1984.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, n. 3, p. 547-55, 1994.

- VAN DER HORST, C. J. The occurrence of phenylalanine- and alpha-aminocaprylic acid-alpha-ketoglutarate transaminase in boar spermatozoa. **Experientia**, v. 26, n. 3, p. 249, 1970.
- VAN DER HORST, C. J.; ELGERSMA, A.; DE BOER, M. J.; BESTEBROER, A. C. Some biochemical parameters for qualification of bull semen. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 104, n. 8, p. suppl 97-108, 1979.
- WESTFALEWICZ, B.; DIETRICH, M. A.; MOSTEK, A.; PARTYKA, A.; BIELAS, W.; NIŻAŃSKI, W.; CIERESZKO, A. Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 3, p. 2282-2298, 2017.
- WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. **J Androl**, v. 22, n. 4, p. 680-95, 2001.
- WILLIAMS, J.; GLADEN, B. C.; SCHRADER, S. M.; TURNER, T. W.; PHELPS, J. L.; CHAPIN, R. E. Semen analysis and fertility assessment in rabbits: statistical power and design considerations for toxicology studies. **Fundam Appl Toxicol**, v. 15, n. 4, p. 651-65, 1990.
- XIA, J.; SINELNIKOV, I. V.; HAN, B.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. W1, p. W251-7, 2015.
- XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nat Protoc**, v. 6, n. 6, p. 743-60, 2011.
- YI, Y. J.; SUTOVSKY, M.; KENNEDY, C.; SUTOVSKY, P. Identification of the inorganic pyrophosphate metabolizing, ATP substituting pathway in mammalian spermatozoa. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34524, 2012.
- YOUSEF, M. I.; EL-MORSY, A. M.; HASSAN, M. S. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. **Toxicology**, v. 215, n. 1-2, p. 97-107, 2005.
- ZHANG, X.; DIAO, R.; ZHU, X.; LI, Z.; CAI, Z. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. **Clin Chim Acta**, v. 450, p. 254-61, 2015.
- ZHOU, X.; WANG, Y.; YUN, Y.; XIA, Z.; LU, H.; LUO, J.; LIANG, Y. A potential tool for diagnosis of male infertility: Plasma metabolomics based on GC-MS. **Talanta**, v. 147, p. 82-9, 2016.
- ZÖPFGEN, A.; PRIEM, F.; SUDHOFF, F.; JUNG, K.; LENK, S.; LOENING, S. A.; SINHA, P. Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. **Hum Reprod**, v. 15, n. 4, p. 840-5, 2000.

ZWALD, N. R.; WEIGEL, K. A.; CHANG, Y. M.; WELPER, R. D.; CLAY, J. S. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 12, p. 4287-94, 2004.

ZWALD, N. R.; WEIGEL, K. A.; CHANG, Y. M.; WELPER, R. D.; CLAY, J. S. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. II. Genetic correlations, disease probabilities, and relationships with existing traits. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 12, p. 4295-302, 2004.

4 CAPÍTULO III

CONSERVAÇÃO EVOLUTIVA E DINÂMICA DE EXPRESSÃO DA INTEGRINA SUBUNIDADE BETA 5 EM GAMETAS E EMBRIÕES BOVINOS

Evolutionary conservation and expression dynamics of Integrin Subunit Beta 5 in bovine gametes and embryos

(Artigo submetido para publicação no periódico *Reproduction, Fertility and Development*)

Conservação evolutiva e dinâmica de expressão da Integrina Subunidade Beta 5 em gametas e embriões bovinos

RESUMO

A fecundação e a pré-implantação são fases críticas do desenvolvimento inicial dos mamíferos, as quais contribuem para o crescimento embrionário posterior e, subsequentemente para a produção de futuros descendentes. As integrinas atuam como receptores de sinalização e reconhecem principalmente ligantes da matriz extracelular na superfície do oócito. Entretanto, seus possíveis papéis na ativação de oócitos e desenvolvimento embrionário ainda não são claramente compreendidos. Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar a expressão da integrina subunidade beta 5 (ITG β 5) em espermatozoides, oócitos e embriões bovinos em fases iniciais de desenvolvimento e, verificar a conservação evolutiva da ITG β 5. Os níveis de expressão da proteína ITG β 5 em espermatozoide de touros foi avaliada pela técnica de western blotting. A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi empregada para avaliar os níveis de expressão de transcritos da ITG β 5 em oócitos e embriões bovinos. Além disso, ferramentas de bioinformática foram utilizadas com o intuito de determinar a conservação evolutiva da proteína ITG β 5 entre várias espécies. Os resultados do western blotting confirmaram a presença da ITG β 5 em espermatozoides de touros. Com base nas análises de RT-qPCR, foi observado que os níveis de ITG β 5 foram significativamente mais elevados nos embriões bovinos de 2 células, seguidos pelos embriões de 8-16 células. No entanto, não foi observada diferença significativa nos níveis de expressão da ITG β 5 nos estágios de mórula e blastocisto em comparação com os oócitos. As análises de bioinformática demonstraram que a ITG β 5 é conservada em várias espécies. Desta forma, nossos resultados demonstram a presença da ITG β 5 em espermatozoides, bem como, em oócitos e embriões bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento, sugerindo um importante papel da ITG β 5 na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial desta espécie.

Palavras-chave: integrinas, gametas, proteína, transcrito, RT-qPCR, western blotting.

Evolutionary conservation and expression dynamics of Integrin Subunit Beta 5 in bovine gametes and embryos

ABSTRACT

Fertilization and pre-implantation are critical phases of early mammalian development, which set the stage for later growth and future offspring. Integrins have been shown to act as signaling receptors and they primarily recognize extracellular matrix ligands on the oocyte surface. However, their possible roles in oocyte activation and embryo development are not clearly understood. Thus, the objectives of this study were to evaluate expression of integrin subunit beta 5 (ITG β 5) in sperm, oocytes and early bovine embryos, and to ascertain the evolutionary conservation of ITG β 5. To accomplish these objectives, expression levels of ITG β 5 protein in bull sperm were evaluated by western blotting. Real time-qPCR was carried out to evaluate the expression levels of ITG β 5 transcripts in oocytes and embryos from bovine species. In addition, bioinformatic tools were performed to determine to evolutionary conservation of ITG β 5 across species. Western blotting results showed the presence of ITG β 5 on bull spermatozoa. Moreover, RT-qPCR results demonstrated that ITG β 5 were significantly higher in 2-cell embryos and 8-16 cell embryos. No significant difference in expression levels were showed in morula and blastocyst stages as compared to bovine oocytes. Bioinformatics analyses showed that ITG β 5 is conserved across species. Therefore, our results showed the presence of ITG β 5 in spermatozoa as well as oocytes and embryos in early stages of development, suggesting an important role of ITG β 5 upon fecundation and early embryo development in the bovine species.

Keywords: integrins, gametes, protein, transcript, RT-qPCR, western blotting

4.1 INTRODUÇÃO

A fusão entre o espermatozoide e o oócito é regulada por diversas moléculas presentes em ambos os gametas masculino e feminino e, envolve a interação entre as células, bem como, entre as células e a matriz extracelular. A superfamília de receptores de adesão celular é chamada de integrinas, as quais reconhecem ligantes da matriz extracelular, localizados na superfície do oócito. As desintegrinas são ligantes das integrinas, perturbando a adesão mediada pelas integrinas na superfície das células espermáticas (GOULD et al., 1990). As integrinas servem como receptores estruturais permitindo a interação célula-célula e célula-matriz, bem como receptores de sinalização que regulam os íons intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), o pH, o inositol e a fosforilação de proteínas no oócito (SCHWARTZ, 1993; MCNAMEE et al., 1996).

As integrinas são proteínas heterodiméricas constituídas por um domínio extracelular e um citoplasmático, formados pelas subunidades α e β (SHRIMALI; REDDY, 2000). Em diversas células de vertebrados, já foram identificadas 18 subunidades α (α_{1-11} , α_v , α_{IIb} , α_E , α_L , α_M , α_X , α_D), as quais são mais longas, e 8 subunidades β (β_{1-8}), que são mais curtas. As subunidades α e β se juntam para formar diferentes combinações, sendo que cada uma dessas associações tem sua especificidade de ligação (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999; EVANS, 2001). Desta forma, as integrinas são uma família de receptores de superfície celular para fibronectina, laminina, fibronectina e colágeno (HYNES, 1987), o que pode indicar um papel na interação entre o espermatozoide e o oócito (FUSI; BERNOCCHI; et al., 1996). Takada et al. (2007) sugeriram que a fosforilação da tirosina no motivo NPxY/F pode ser o modo de interação das integrinas com outras proteínas de membrana. Assim sendo, como as integrinas podem mediar a adesão celular, elas podem ser, portanto, alvos importantes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos (HUMPHRIES, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que a integrina alfa4-beta7 participa da aderência de linfócitos à fibronectina, à uma molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) e à linfócitos de agrupamento de células homotípicas (RUEGG et al., 1992). Thys et al. (2009) mostraram que os espermatozoides bovinos expressam a integrina alfa5-beta1, a qual desempenha um papel importante na fertilização. Já Silva et al. (2015) mostraram a presença da integrina subunidade beta-5 (ITG β 5) testículo humano e no fluido do epidídimo. Além disso, polimorfismos nucleotídicos únicos na ITG β 5 foram associados à fertilidade de touros (FEUGANG et al., 2009).

Embora tenha sido demonstrado que as integrinas atuam como receptores de sinalização, as suas possíveis funções na ativação de oócitos e no desenvolvimento embrionário não são claramente compreendidas. Estas lacunas no conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam estas moléculas dificulta a compreensão completa de todas as etapas cruciais envolvidas na fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial de mamíferos. Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram determinar a expressão da ITG β 5 em espermatozoides, oócitos e embriões de bovinos nas fases iniciais de desenvolvimento e, verificar a conservação evolutiva da ITG β 5.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Determinação da fertilidade dos touros

As amostras de sêmen criopreservado e os dados de fertilidade de oito touros com diferentes fenótipos de fertilidade foram fornecidos pela *Alta Genetics* (Watertown, WI, EUA). Os touros foram selecionados com base na sua fertilidade, como descrito anteriormente por Peddinti et al. (2008). Os fatores que influenciam o desempenho de fertilidade dos animais, tais como: fatores ambientais e de manejo de rebanho, foram ajustados por meio de modelos estatísticos semelhantes aos descritos por Zwald et al. (2004). A predição de fertilidade de cada touro foi obtida usando o software *Probit.F90* (CHANG et al., 2004) e expressa como a percentagem de desvio da taxa de concepção de cada bovino em relação a taxa de concepção média de todos os touros. A tabela 1 fornece a lista de touros e seus dados de fertilidade.

Tabela 1. Dados de fertilidade dos touros. O escore de fertilidade de cada touro foi obtido usando o software *Probit.F90* e expresso como a porcentagem de desvio das suas taxas de concepção em relação à média de concepção de todos os touros.

Número dos touros	Escore de fertilidade (Porcentagem de desvio da taxa concepção do touro em relação à média)
1	3,7
2	2,6
3	2,5
4	-3,1
5	-3,5
6	-4,0
7	-4,2
8	-4,9

4.2.2 Determinação dos níveis de expressão da *ITGβ5* em espermatozoides de touros

4.2.2.1 Extração e quantificação de proteínas espermáticas

As proteínas das membranas plasmáticas das células espermáticas dos touros foram extraídas de acordo com o método descrito por Escoffier et al. (2015), com modificações. Resumidamente, as palhetas de sêmen criopreservado dos oito touros foram descongeladas em banho-maria a 37°C, durante 1 minuto e, os espermatozoides foram separados do diluidor por centrifugação (700 x g, 4°C, 5 min). Posteriormente, as células espermáticas foram lavadas duas vezes, por meio de centrifugação (700 x g, 4°C, 5 min), com tampão fosfato salino (PBS) contendo coquetel de inibidor de protease (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Em seguida, a contagem total de espermatozoides foi determinada utilizando um hemocítmetro. Aproximadamente 20×10^6 células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de amostra *Laemmli* (2% de SDS, 10% de glicerol e 0,0625 M de Tris-HCl) sem β-mercaptoetanol, foram agitadas com *vortex* durante 1 minuto e aquecidas a 98°C, durante 5

minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 x g, a 4°C, por 5 minutos e, os sobrenadantes contendo as proteínas espermáticas foram recuperados e transferidos para um novo tubo, onde 5% de β -mercaptoetanol foi adicionado. Logo em seguida, as amostras foram aquecidas à 98°C, durante 5 minutos e, imediatamente congeladas a -80°C, até posteriores análises.

Após o descongelamento das amostras, a concentração das proteínas foi determinada em triplica utilizando o kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 2* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Posteriormente, as proteínas foram precipitadas com acetona fria a -20°C, durante 3 horas, seguida por centrifugação (10.000 x g, 4°C, 10 min). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos em 30 μ l de tampão de amostra *Laemmli* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) com 5% de β -mercaptoetanol e armazenados a -80°C.

4.2.2.2 Análises por western blotting da ITG β 5 nos espermatozoides de touros

Uma alíquota de proteínas espermáticas (20 μ g) de cada amostra foi agitada com *vortex*, aquecida a 98°C, durante 10 minutos e separada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 4-20%, gel Mini-Protean TGXTM, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Em seguida, as proteínas foram transferidas dos géis para uma membrana de PVDF (*Immobilon®-P polyvinylidene difluoride difluoreto*), durante 2,5 horas, utilizando um sistema de transferência semi-seco *HEP-1* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), ajustado a uma corrente de 46mA. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com 5% de albumina sérica bovina (BSA), diluída em PBS com 0,1% de Tween 20 (PBS-T), à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpos primários específico contra a ITG β 5, obtido de caprino, na diluição de 1:2.000 (sc-5402, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) e específico para tubulina beta 2C (TUB β 2C), obtido de rato, na diluição de 1:500 (sc-134230; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), os quais foram diluídos em PBS -T com 1% de BSA. A TUB β 2C foi utilizada como controle interno. As membranas foram, então, lavadas três vezes com PBS-T durante 10 minutos cada. Em seguida, as membranas foram incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários conjugados com HRP (horse radish peroxidase), anti-IgG de caprino (sc-2768, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) e anti-IgG de rato (sc-134230, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) e com o reagente

Precision Protein[™] *StrepTactin-HRP Conjugate* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), diluídos de 1:10.000 cada, em solução de 1% de BSA em PBS-T. Após 3 lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas com os reagentes de quimioluminescência *Clarity*[™] *Western ECL Substrate* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). As bandas foram detectadas por meio do *software Image Laboratory* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) com uma exposição de 30 segundos. A intensidade da banda de ITGβ5 foi analisada pelo *software ImageJ*, versão 1.49 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

4.2.3 PCR em tempo real para determinar os níveis de transcritos da ITGβ5 em oócitos e embriões bovinos

4.2.3.1 Primers

Os *primers* foram desenhados utilizando o *software Primer3Plus* (UNTERGASSER et al., 2007) e a sequência de referência de RNAm da ITGβ5 contida no NCBI (National Center for Biotechnology Information; NM_174679). Os *primers* foram escolhidos com base nos seguintes critérios: número de pares de bases, percentagem de C-G e temperatura de *melting* (Tm). Os *primers* foram testados utilizando o *software Primer Premier*, o qual permitiu analisar o potencial para a formação de dímeros de *primers*, dímeros cruzados, *priming* falsos e grampos. Inicialmente, foram testados dois *primers*, o primeiro *primer* escolhido (181 ITGβ5) apresentou 20 bases de comprimento, Tm de 60°C e percentual de C-G de 55% e o segundo *primer* (230 ITGβ5) exibiu 20 bases de comprimento, Tm de 60°C e percentual de C-G de 45%.

As condições dos *primers* foram testadas utilizando cDNA obtidos de blastocistos e células de oócitos de bovinos. Os *primers* foram ajustados utilizando-se um gradiente de temperatura de 56°C-60°C em 1,5 MgCl₂ e, em seguida, uma condição de *primer* ótimo (181 ITGβ5: 1,25 MgCl₂ a 58°C e 230 ITGβ5: 1,25 MgCl₂ a 55,7°C). A concentração de cDNA do blastocisto foi de 40 ng/μL, e a concentração de cDNA das células de oócitos foi de 55 ng/μL. As amostras foram colocadas em *Eppendorf Mastercycler* com um programa de PCR de 95°C por 3 minutos, 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos. O gradiente de temperatura foi ajustado de 56°C a 60°C. As amostras foram, então, avaliadas

por meio de SDS-PAGE, empregando uma voltagem de 110 V, durante 90 minutos. Os resultados foram visualizados utilizando um transiluminador UV.

4.2.3.2 Extração, quantificação e purificação do RNA e síntese do cDNA

O RNA total foi obtido a partir de oócitos, embriões de 2 células, embriões de 8 a 16 células, mórulas e blastocistos (SAGIRKAYA et al., 2006) utilizando o kit *RNeasy Micro* (Qiagen, Valência, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade e pureza de RNA isolado foi determinada utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop*. A qualidade de RNA isolado total foi estimada utilizando o kit *Agilent Bioanalyzer 2100 RNA 6000 picochip* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). O RNA de todos os grupos foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit *RTR-qPCR SuperScript III Platinum de Two Steps*, de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85° por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 0,5 µL de RNase H de *E. coli* e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos.

4.2.3.3 Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada para avaliar a abundância de transcritos da *ITGβ5* em relação ao *housekeeping* *GAPDH*. A avaliação quantitativa da amplificação do RNA foi detectada por *SYBR® GreenER™ qPCR SuperMixes* para *iCycler*. Uma mistura de *primers* foi preparada utilizando 5 µL do *primer* direto, 5 µL do *primer* reverso e 40 µL de água sem a presença de nuclease. Em seguida, 495 µL de *SYER® GreenER™ qPCR SuperMix* para *iCycler®*, 19,8 µL de mistura de *primers* e 409,2 µL de água tratada com o reagente dietil pirocarbonato (DEPC) foram combinados em um tubo para a realização de um total de 66 reações. Uma alíquota de 14 µL desta mistura foi colocada em cada poço da placa de PCR e 1 µL de cDNA (volume total da mistura: 15 µL) foi adicionado a todos os poços das amostras, enquanto 1 µL de água bidestilada (ddH₂O) foi adicionado aos poços do controle negativo. Posteriormente, a placa de PCR foi centrifugada (1000 x g, 4°C, 1 min) e, em seguida, colocada

no *iCycler iQ Real-Time PCR*. Os ciclos do RT-qPCR foram ajustados para 50°C por 2 minutos, 95°C por 8,5 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 60°C e 40 ciclos de 30 segundos a 72°C, seguido de 1 minuto a 95°C e 1 minuto a 55°C. A curva de *melting* foi ajustada para iniciar a partir de 55°C com aumentos de 0,5°C por 80 ciclos de 10 segundos. Os valores de expressão foram calculados utilizando o método da curva padrão relativa.

4.2.4 Análise estatística

Os resultados dos RT-qPCR foram analisados pelo programa SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc. Carey, NC), por meio de análise de variância (ANOVA). A ferramenta do software de expressão relativa (REST - *relative expression software tool*) foi utilizada para comparar todas as amostras. (FEUGANG et al., 2010).

4.2.5 Análises de bioinformática da proteína ITGβ5

4.2.5.1 Alinhamento de sequências múltiplas de aminoácidos e avaliação da percentagem de identidade da proteína ITGβ5 de bovino em comparação com outras espécies

As sequências de aminoácidos da proteína ITGβ5 do boi (*Bos taurus*), homem (*Homo sapiens*), camundongo (*Mus musculus*), babuíno (*Papio cynocephalus*), macaco-rhesus (*Macaca mulata*), cão (*Canis lupus familiaris*), carneiro (*Ovis aries*), cavalo (*Equus caballus*), gato (*Felis catus*), gorila (*Gorilla gorilla*), peixe-zebra (*Danio rerio*), porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), rã (*Xenopus laevis*), elefante (*Loxodonta africana*), peru (*Meleagris gallopavo*), galo (*Gallus gallus*) e porco (*Sus scrofa domesticus*) foram obtidas no programa Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Posteriormente, o alinhamento dessas sequências múltiplas da ITGβ5 foi gerado pelo programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), que está disponível *on-line* no Instituto de Bioinformática Europeu (<http://www.ebi.ac.uk/>).

O programa *Clustal Omega* também foi usado para determinar a percentagem de identidade das sequências de aminoácidos da proteína ITGβ5 de bovinos em comparação com

as das outras espécies (homem, camundongo, babuíno, macaco-rhesus, cão, carneiro, cavalo, gato, gorila, peixe-zebra, porquinho-da-índia, rã, elefante, peru, galo e porco).

4.2.5.2 *Análise de *dottup* de similaridade das sequências de aminoácidos da ITGβ5 entre bovino, humano e camundongo*

As comparações de similaridade das sequências de aminoácidos da proteína ITGβ5 foram realizadas utilizando uma ferramenta *dottup* disponível *on-line* no *European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) Pairwise Alignment Algorithms*. As comparações utilizadas foram bovino vs. humano, bovino vs. camundongo, e humano vs. camundongo.

4.2.5.3 *Árvore filogenética da ITGβ5*

A árvore filogenética com as 17 sequências de aminoácidos da ITGβ5 de bovino, homem, camundongo, babuíno, macaco-rhesus, cão, carneiro, cavalo, gato, gorila, peixe-zebra, porquinho-da-índia, rã, elefante, peru, galo e porco foi obtida utilizando o programa MEGA 6.

4.2.5.4 *Domínios conservados da ITGβ5*

As sequências de aminoácidos da proteína ITGβ5 foram analisadas utilizando o banco de dados *Conserved Domain Database (CDD)* do *NCBI/BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool). Os domínios conservados a partir do alinhamento das sequências foram determinados utilizando um software que faz parte do pacote *MSAVIS* (LINDEMAN et al., 2007).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Detecção da proteína ITG β 5 nos espermatozoides de touros

Foi realizada a análise de western blotting para avaliar a expressão da proteína ITG β 5 na membrana plasmática dos espermatozoides de touros com diferentes fertilidades *in vivo*. Os resultados mostraram que a proteína ITG β 5 está presente na membrana plasmática dos espermatozoides de todos os touros avaliados (Figura 1).

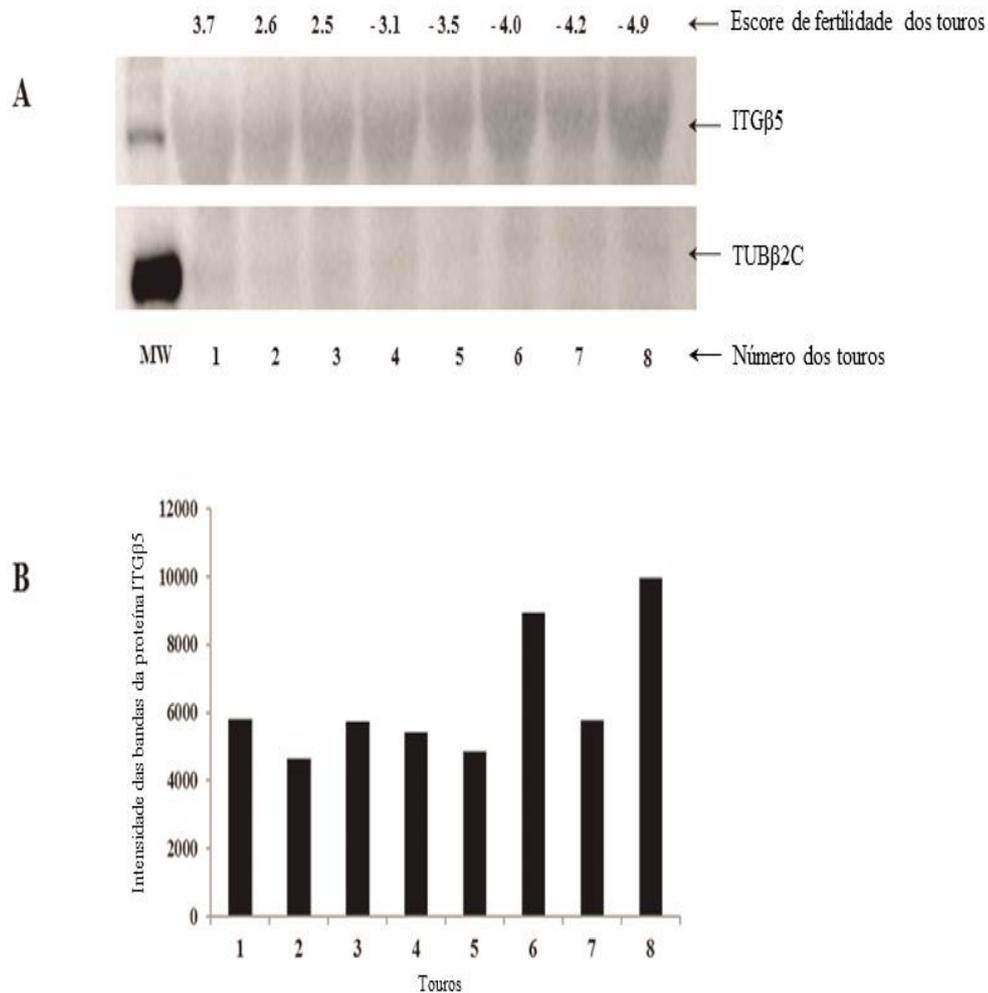


Figura 1. Níveis de expressão da proteína ITG β 5 na membrana plasmática das células espermáticas de touros. (A) Análise de western blotting da proteína ITG β 5 nos espermatozoides de touros (1-8) com diferentes escores de fertilidade. (B) Intensidades das bandas da proteína ITG β 5 nos espermatozoides de touros (1-8). MW: peso molecular.

4.3.2 Expressão de transcritos da ITGβ5 em oócitos e embriões bovinos

Os níveis de expressão de transcritos da ITGβ5 foram determinados em oócitos, embriões de 2 células, embriões de 8 a 16 células, mórulas e blastocistos utilizando RT-qPCR. A maior abundância de transcritos de ITGβ5 foi detectada em embriões de 2 células ($P < 0,05$), seguido por embriões de 8-16 células. Não foi observada diferença significativa no número de transcritos nos estágios de mórula e blastocisto em comparação com os oócitos. A quantidade de transcritos de ITGβ5 em oócitos foi equivalente ao de embriões de 8 a 16 células. (Figura 2)

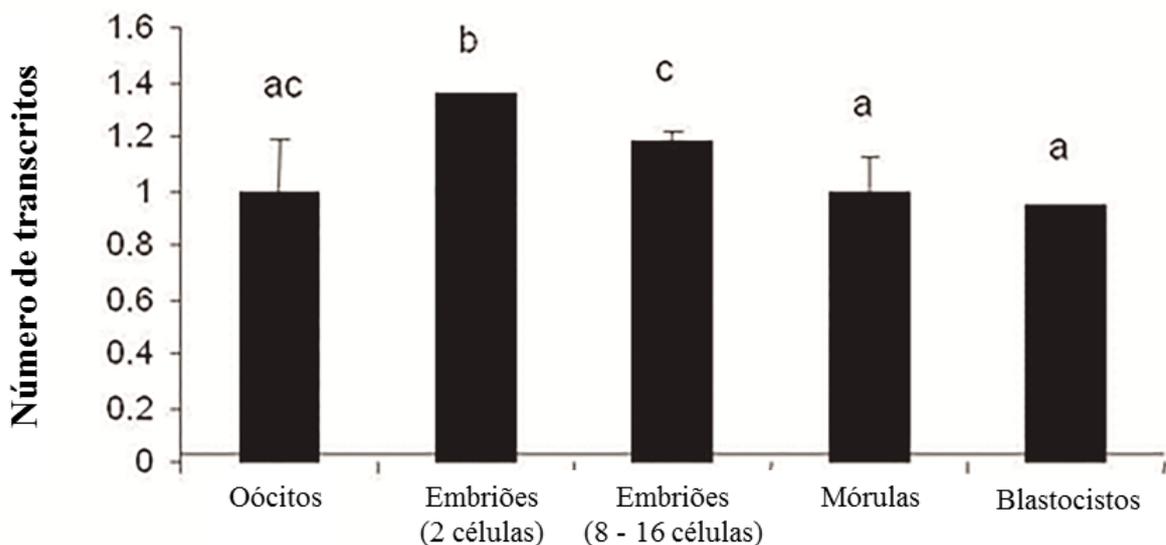


Figura 2. Número de transcritos de ITGβ5 em oócitos, embriões de 2 células, embriões de 8 a 16 células, mórulas e blastocistos bovinos. A análise por RT-qPCR foi realizada para avaliar a abundância de transcritos da ITGβ5. Os transcritos nos oócitos e embriões bovinos foram analisados estatisticamente utilizando uma análise de variância. Letras diferentes correspondem às diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as amostras analisadas.

4.3.3 Conservação evolutiva da ITGβ5

Utilizando o programa *EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms* foram obtidos os índices percentuais de identidade da sequência de aminoácidos da proteína ITGβ5 de bovinos em comparação com a de outras espécies. A percentagem de identidade da ITGβ5 de boi *versus* carneiro foi de 96,5%, de boi *versus* homem foi de 90,55% e de boi *versus* camundongo foi de

89,41%. Os índices percentuais de identidade da sequência de aminoácidos da ITG β 5 de bovinos em comparação com a de outras espécies variaram de 96,5% para bovinos *versus* carneiros a 68,69% para bovinos *versus* rãs (Tabela 2).

Tabela 2. Percentagem de identidade da sequência de aminoácidos da proteína ITG β 5 de bovino *versus* 17 espécies. As percentagens de identidade foram obtidas por meio do programa *Clustal Omega*.

Espécies	Percentagem (%) de identidade da proteína ITGβ5 de bovino <i>vs.</i> outras espécies
Carneiro	96,50
Porco	95,00
Cavalo	94,98
Babuíno	92,67
Elefante	92,02
Gorila	90,77
Gato	90,75
Homem	90,55
Macaco-rhesus	90,30
Camundongo	89,41
Porquinho-da-índia	88,53
Cão	86,04
Galo	76,54
Peru	76,01
Peixe-zebra	70,62
Rã	68,69

A análise de *dottup* das sequências da proteína ITG β 5 de bovino, rato e humano mostrou uma conservação estrutural significativa com poucas lacunas entre as três sequências (Figura 3). Adicionalmente, a árvore filogenética revelou que a proteína ITG β 5 apresenta uma conservação evolutiva entre as 17 espécies avaliadas. A árvore filogenética também mostrou que existe uma maior semelhança entre a sequência de aminoácidos da proteína ITG β 5 de bovinos e carneiros, do que entre a espécie bovina e as outras espécies estudadas (Figura 4). Os domínios conservados foram determinados por meio das análises de 17 sequências de aminoácidos a proteína ITG β 5 no banco de dados *Conserved Domain Database (CDD)* do *NCBI/BLAST*. Em todas as espécies avaliadas, os domínios conservados que foram encontrados incluíram o da superfamília do fator de Von Willebrand tipo A (vWFA), da integrina beta cauda e o domínio citoplasmático beta da integrina (Figura 5).

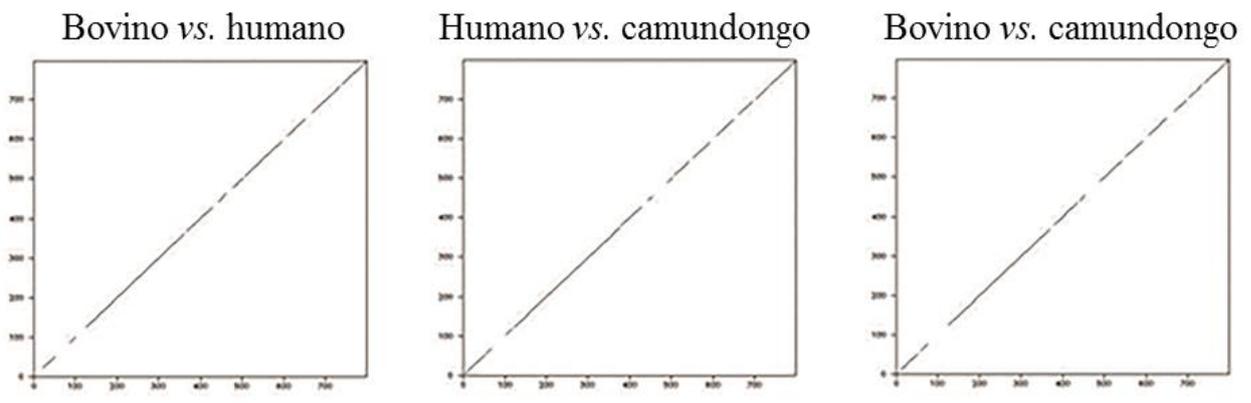


Figura 3. Semelhanças das sequências de aminoácidos da proteína ITG β 5 entre bovino, humano e camundongo. A análise de *dottup* foi realizada para comparar a similaridade das sequências de aminoácidos da proteína ITG β 5 entre as espécies. Uma linha diagonal contínua indica semelhança entre as sequências e a ruptura da linha indica baixa similaridade. O tamanho da janela utilizada foi de 10.

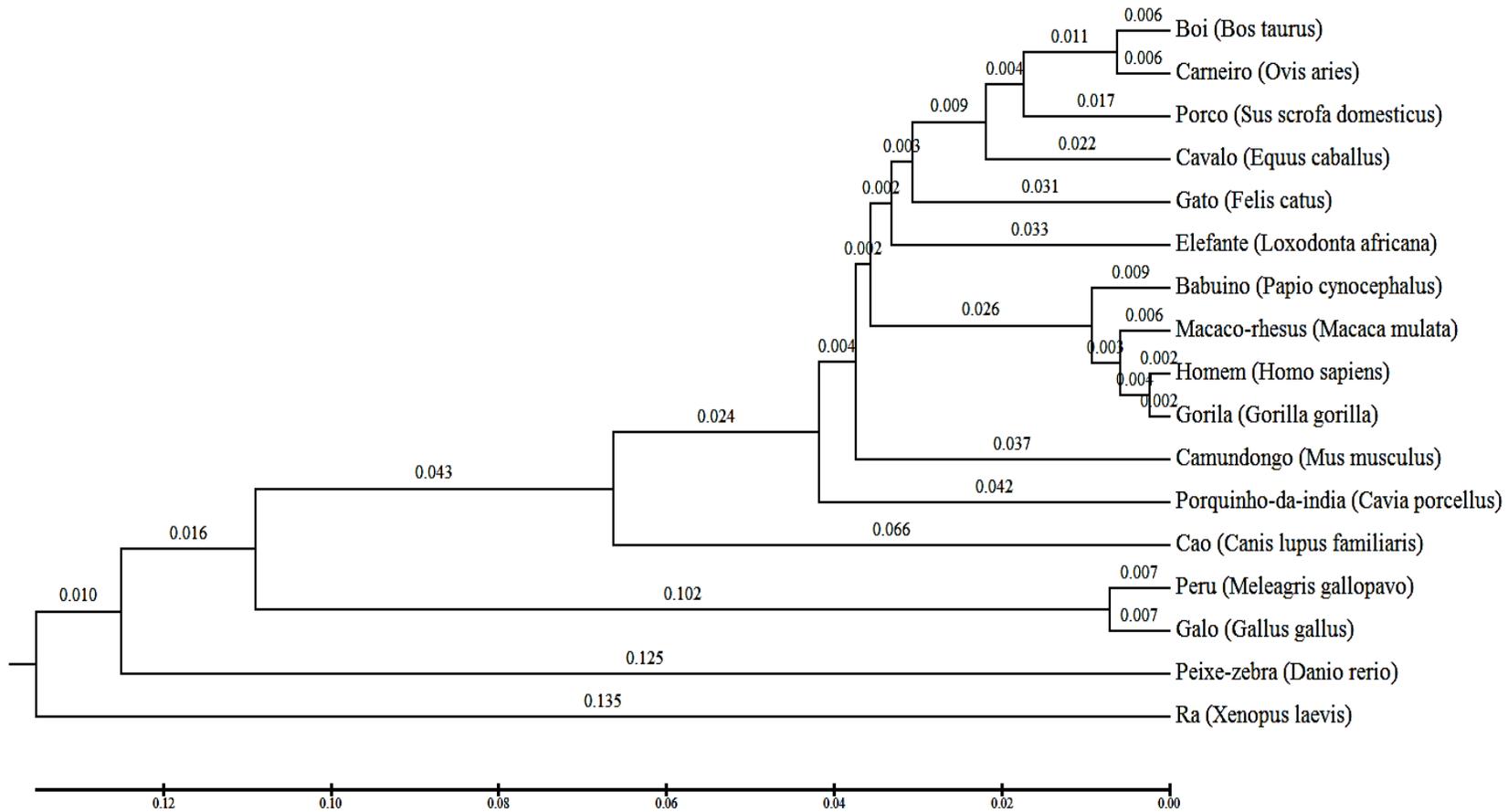


Figura 4. Árvore filogenética da proteína ITGB5. A análise de comparação evolutiva da proteína ITGB5 entre as espécies de animais foi realizada pelo programa MEGA 6 e envolveu 17 seqüências de aminoácidos.

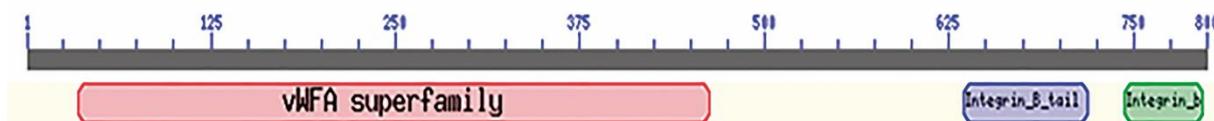


Figura 5. Domínios conservados da proteína ITG β 5. Os domínios da ITG β 5 são a superfamília do fator de Von Willebrand tipo A (vWFA), integrina beta cauda e domínio citoplasmático beta da integrina.

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós avaliamos a presença da proteína ITG β 5 em espermatozoides de touros por meio da técnica de western blotting. Nós analisamos, também, os níveis de expressão de transcritos da ITG β 5 em oócitos e embriões bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento utilizando o método de RT-qPCR, a fim de se ter uma melhor compreensão do papel da ITG β 5 na ativação de oócitos, no desenvolvimento embrionário e nas redes moleculares responsáveis pela fertilidade de bovinos. Adicionalmente, nós utilizamos ferramentas de bioinformática para identificar as sequências e os domínios conservados da proteína ITG β 5 em diferentes espécies. Assim sendo, este estudo demonstrou, pela primeira vez, que a ITG β 5 está presente em espermatozoides de touros. Ele forneceu, ainda, evidências de que os transcritos da ITG β 5 estão presentes em oócitos e que os níveis de expressão desses transcritos são elevados em embriões bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento. Além disso, as análises evolutivas da ITG β 5 mostraram que esta proteína é conservada em várias espécies e provavelmente deve estar presente em muitas outras.

As integrinas mediam a adesão celular à vitronectina e provavelmente influenciam a interação entre espermatozoide e oócito (FUSI; BERNOCCHI; et al., 1996). Em homens, a vitronectina já foi relatada como sendo sintetizada durante a espermatogênese e liberada logo após a capacitação (FUSI et al., 1994). No entanto, um estudo anterior relatou que os receptores de integrina α e β em humanos apenas aparecem após a capacitação (FUSI; TAMBURINI; et al., 1996). Nossos resultados mostraram que a ITG β 5 é expressa nos oócitos e na membrana plasmática dos espermatozoides de bovinos. Estes achados estão de acordo com os observados por Finaz e Hammami-Hamza (2000), que demonstraram evidências de que a ITG β 5 está envolvida na fusão do espermatozoide e oócito e que ela está localizada na superfície de ambos

os gametas masculino e feminino de humanos. Os resultados do presente estudo, também, corroboram com estudos anteriores, os quais relataram que a proteína integrina $\beta 1$ é expressa na superfície de espermatozoides de homens (GLANDER; SCHALLER, 1993; REDDY et al., 1998; BARRAUD-LANGE et al., 2007) e com o estudo realizado por Feugang et al. (2009), no qual foi observado uma diminuição da capacidade de fertilização do oócito pelas células espermáticas de touros incubadas com anticorpos anti-ITG $\beta 5$, o que demonstra a presença da proteína ITG $\beta 5$ na membrana dos espermatozoides bovinos.

No presente estudo, nós mostramos, por meio de análises de bioinformática, que a proteína ITG $\beta 5$ é conservada em diversas espécies e que contem domínios de vWFA, os quais estão envolvidos no processo de adesão celular e de interação proteína-proteína. Em função disto, tem sido relatado que a expressão das integrinas, em ambos os gametas, está implicada na interação entre o espermatozoide e o oócito (BARRAUD-LANGE et al., 2007). Desta forma, uma vez que as integrinas, grandes glicoproteínas heterodiméricas, atuam como receptores de superfície celular para a matriz extracelular e podem participar da adesão entre células (WHITTAKER; HYNES, 2002), sugere-se que a expressão da ITG $\beta 5$ na membrana das células espermáticas e no oócito é importante nas etapas de adesão e fusão dessas células durante o processo de fecundação.

Sabe-se que logo após a fusão do espermatozoide e do oócito, é iniciada a clivagem celular (BRONSON et al. 2000) e que o desenvolvimento contínuo do embrião resulta, então, na produção do trofotoderma e da massa celular interna pluripotente (MITALIPOV; WOLF, 2009). Assim sendo, em um estudo realizado em camundongos, por Miranda et al. (2011), foi sugerido que a transcrição de *Nanog*, ativada pelo gene da proteína priônica (PRNP) por meio da ITG $\beta 5$, pode regular essa pluripotência das células embrionária (MIRANDA et al., 2011). Neste estudo, os autores demonstraram que a inibição da ITG $\beta 5$, impede a expressão de *Nanog* e, conseqüentemente, inibe a pluripotência. Deste modo, pode-se acreditar que a pluripotência é dependente da ITG $\beta 5$, sendo assim, a baixa expressão desta molécula, transmitida pelos espermatozoides, poderia impedir o desenvolvimento embrionário inicial ou sua sustentabilidade, devido a incapacidade de clivagem das células, logo após a fertilização.

Como tem sido demonstrado, as integrinas participam da comunicação entre o espermatozoide e o oócito, bem como, estão envolvidas no início das vias de sinalização intracelular (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). Além disso, acredita-se que as integrinas influenciam o desenvolvimento de embriões em estágio inicial de desenvolvimento (TAGA; SUGINAMI, 1998). Neste contexto, um estudo anterior relatou que as integrinas facilitam a

ligação dos espermatozoides ao oócito e que seus níveis de expressão aumentam durante as fases de desenvolvimento embrionário inicial e implantação (SUEOKA et al., 1997). Corroborando com esses achados, nós encontramos, no presente estudo, níveis de expressão da ITG β 5 significativamente mais elevados nos embriões bovinos de 2 células, comparados aos de 8 a 16 células e à embriões em estágios de desenvolvimento mais tardios. A elevada expressão da ITG β 5 no estágio embrionário de 2 células, logo depois da fecundação, indica a importância desta molécula não somente no momento da ligação do espermatozoide ao oócito, mas também nas fases que ocorrem imediatamente após a fertilização. Desta forma, o aumento da expressão dos transcritos logo no início do desenvolvimento embrionário é indicativo de uma possível embriogênese dependente de ITG β 5. Isto poderia mostrar a interface molecular da fusão espermatozoide-oócito necessária para iniciar ou manter o desenvolvimento embrionário precoce. Sendo assim, todos esses achados indicam que as integrinas podem desempenhar múltiplos papéis nas fases de fertilização, embriogênese e implantação.

4.5 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram a presença da ITG β 5 em espermatozoides, bem como em oócitos e embriões bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento. Além disso, as análises de bioinformática, mostraram que a proteína ITG β 5 é altamente conservada entre várias espécies. Diante do exposto, os resultados do presente estudo suportam a ideia de que ITG β 5 pode ter um importante papel na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial na espécie bovina.

REFERÊNCIAS

BARRAUD-LANGE, V.; NAUD-BARRIANT, N.; SAFFAR, L.; GATTEGNO, L.; DUCOT, B.; DRILLET, A. S.; BOMSEL, M.; WOLF, J. P.; ZIYYAT, A. Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. **BMC Dev Biol**, v. 7, p. 102, 2007.

BRONSON, R.; PERESLENI, T.; GOLIGHTLY, M.; EISSNER, K. Vitronectin is sequestered within human spermatozoa and liberated following the acrosome reaction. **Mol Hum Reprod** v. 6, p. 977-982, 2000.

CHANG, Y.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G. Effects of trait definition on genetic parameter estimates and sire evaluation for clinical mastitis with threshold models. **Animal Science**, v. 79, p. 355-363, 2004.

ESCOFFIER, J.; NAVARRETE, F.; HADDAD, D.; SANTI, C. M.; DARSZON, A.; VISCONTI, P. E. Flow cytometry analysis reveals that only a subpopulation of mouse sperm undergoes hyperpolarization during capacitation. **Biol Reprod**, v. 92, n. 5, p. 121, 2015.

EVANS, J. P. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. **Bioessays**, v. 23, n. 7, p. 628-39, 2001.

FEUGANG, J. M.; KAYA, A.; PAGE, G. P.; CHEN, L.; MEHTA, T.; HIRANI, K.; NAZARETH, L.; TOPPER, E.; GIBBS, R.; MEMILI, E. Two-stage genome-wide association study identifies integrin beta 5 as having potential role in bull fertility. **BMC Genomics**, v. 10, p. 176, 2009.

FEUGANG, J. M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G. C.; TOPPER, E. K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reprod Biomed Online**, v. 21, n. 3, p. 312-24, 2010.

FINAZ, C.; HAMMAMI-HAMZA, S. Adhesion proteins expressed on human gamete surfaces and egg activation. **Biol Cell**, v. 92, n. 3-4, p. 235-44, 2000.

FUSI, F. M.; BERNOCCHI, N.; FERRARI, A.; BRONSON, R. A. Is vitronectin the velcro that binds the gametes together? **Mol Hum Reprod**, v. 2, n. 11, p. 859-66, 1996.

FUSI, F. M.; LORENZETTI, I.; MANGILI, F.; HERR, J. C.; FREEMERMAN, A. J.; GAILIT, J.; BRONSON, R. A. Vitronectin is an intrinsic protein of human spermatozoa released during the acrosome reaction. **Mol Reprod Dev**, v. 39, n. 3, p. 337-43, 1994.

FUSI, F. M.; TAMBURINI, C.; MANGILI, F.; MONTESANO, M.; FERRARI, A.; BRONSON, R. A. The expression of alpha v, alpha 5, beta 1, and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. **Mol Hum Reprod**, v. 2, n. 3, p. 169-75, 1996.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1028-32, 1999.

GLANDER, H. J.; SCHALLER, J. Beta 1-integrins of spermatozoa: a flow cytophotometric analysis. **Int J Androl**, v. 16, n. 2, p. 105-11, 1993.

GOULD, V. E.; KOUKOULIS, G. K.; VIRTANEN, I. Extracellular matrix proteins and their receptors in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. **Cell Differ Dev**, v. 32, n. 3, p. 409-16, 1990.

HUMPHRIES, M. J. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 1, p. 29-32, 2000.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 4, p. 549-54, 1987.

LINDEMAN, M. A.; BARGER, K. A.; BRANDL, D. E.; CROWDER, S. G.; ROCKS, L.; MCCAMMON, D. Complex impedance measurements of calorimeters and bolometers: correction for stray impedances. **Rev Sci Instrum**, v. 78, n. 4, p. 043105, 2007.

MCNAMEE, H. P.; LILEY, H. G.; INGBER, D. E. Integrin-dependent control of inositol lipid synthesis in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. **Exp Cell Res**, v. 224, n. 1, p. 116-22, 1996.

MIRANDA, A.; PERICUESTA, E.; RAMIREZ, M. A.; GUTIERREZ-ADAN, A. Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18422, 2011.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 114, p. 185-99, 2009.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Syst Biol**, v. 2, p. 19, 2008.

REDDY, K. V.; MEHERJI, P. K.; SHAHANI, S. K. Integrin cell adhesion molecules on human spermatozoa. **Indian J Exp Biol**, v. 36, n. 5, p. 456-63, 1998.

RUEGG, C.; POSTIGO, A. A.; SIKORSKI, E. E.; BUTCHER, E. C.; PYTELA, R.; ERLE, D. J. Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. **J Cell Biol**, v. 117, n. 1, p. 179-89, 1992.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 131, n. 5, p. 895-904, 2006.

SCHWARTZ, M. A. Signaling by integrins: implications for tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 53, n. 7, p. 1503-6, 1993.

SHRIMALI, R. K.; REDDY, K. V. Integrins and disintegrins: the candidate molecular players in sperm-egg interaction. **Indian J Exp Biol**, v. 38, n. 5, p. 415-24, 2000.

SILVA, J. V.; YOON, S.; DOMINGUES, S.; GUIMARAES, S.; GOLTSEV, A. V.; DA CRUZ, E. S. E. F.; MENDES, J. F.; DA CRUZ, E. S. O. A.; FARDILHA, M. Amyloid precursor protein interaction network in human testis: sentinel proteins for male reproduction. **BMC Bioinformatics**, v. 16, p. 12, 2015.

SUEOKA, K.; SHIOKAWA, S.; MIYAZAKI, T.; KUJI, N.; TANAKA, M.; YOSHIMURA, Y. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. **Fertil Steril**, v. 67, n. 5, p. 799-811, 1997.

TAGA, M.; SUGINAMI, H. Cell adhesion and reproduction. An overview. **Horm Res**, v. 50 Suppl 2, p. 2-6, 1998.

TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. 215, 2007.

THYS, M.; NAUWYNCK, H.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; VERCAUTEREN, D.; RIJSSELAERE, T.; FAVOREEL, H.; VAN SOOM, A. Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin alpha(5)beta(1)) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 471-82, 2009.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Web Server issue, p. W71-4, 2007.

WHITTAKER, C. A.; HYNES, R. O. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 10, p. 3369-87, 2002.

ZWALD, N. R.; WEIGEL, K. A.; CHANG, Y. M.; WELPER, R. D.; CLAY, J. S. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 12, p. 4287-94, 2004.

ZWALD, N. R.; WEIGEL, K. A.; CHANG, Y. M.; WELPER, R. D.; CLAY, J. S. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. II. Genetic correlations, disease probabilities, and relationships with existing traits. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 12, p. 4295-302, 2004.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

No presente trabalho, foi determinado o metaboloma do plasma seminal de touros, sendo que o ácido 2-oxoglutárico e a frutose foram considerados marcadores moleculares candidatos de fertilidade nesses animais. Adicionalmente, foi mostrado que a ITG β 5 é expressa nos espermatozoides, oócitos e embriões bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento e que a proteína ITG β 5 é conservada em diferentes espécies.

O estudo metabolômico do presente trabalho é inédito e incluiu etapas iniciais e essenciais na investigação do metaboloma do plasma seminal bovino, uma vez que os metabólitos foram mapeados, quantificados e seus padrões foram identificados em touros com diferentes fenótipos de fertilidade. Desta forma, esta pesquisa foi fundamental, pois os metabólitos identificados no presente estudo como potenciais biomarcadores poderão ser futuramente utilizados para prever a fertilidade de touros e melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos. Além disso, futuros estudos poderão ser realizados para avaliar se a adição desses metabólitos em crioprotetores e diluidores seminais melhoram as taxas de fertilidade após a inseminação artificial. Esses metabólitos poderão, ainda, ser testados em sistemas de FIV, como estratégia para melhorar a eficiência na produção de embriões.

Como pode ser observado pelo presente trabalho, integrada em uma abordagem de biologia de sistemas, a metabolômica pode ser combinada com outras ciências “ômicas”, como a genômica, transcriptômica e proteômica, para proporcionar uma melhor compreensão da fisiologia da reprodução em animais e em seres humanos, como a identificação de classes específicas de moléculas, levando, assim, a diagnósticos e tratamentos moleculares personalizados. Além disso, o uso complementar dessas abordagens, pode ser uma importante ferramenta na compreensão e predição da fertilidade, através da determinação de biomarcadores associados a esta condição, podendo auxiliar no diagnóstico precoce de distúrbios reprodutivos masculinos e femininos. Apesar da metabolômica poder ser empregada junto com outras abordagens, ela tem uma vantagem em relação as outras análises “ômicas”, pois ela é um método poderoso e de confiança para a identificação de metabólitos totais presentes em diferentes sistemas biológicos e sob uma dada condição fisiológica e/ou patológica, as mudanças nos metabólitos e nas suas concentrações são amplificadas e podem ser maiores do que as observadas no transcriptoma e no proteoma. Assim sendo, os achados do presente trabalho fornecem um alicerce para que sejam realizados futuros estudos sobre as redes

moleculares envolvidas na fertilidade e infertilidade e, conseqüentemente, nas etapas de fertilização e de desenvolvimento embrionário de animais e seres humanos.