



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

**EDUARDO RODRIGUES PESSOA**

**PERFIL METABOLÔMICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS GUZERÁ (*BOS TAURUS INDICUS*) COM DIFERENTES PARÂMETROS DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

**FORTALEZA**

**2021**

EDUARDO RODRIGUES PESSOA

PERFIL METABOLÔMICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS GUZERÁ (*BOS TAURUS INDICUS*) COM DIFERENTES PARÂMETROS DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN

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

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

Co-orientador: Dr. Fábio Roger Vasconcelos.

FORTALEZA

2021

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)

---

- P567p Pessoa, Eduardo Rodrigues.  
Perfil metabólico do plasma seminal de touros Guzerá (*Bos taurus indicus*) com diferentes parâmetros de congelabilidade do sêmen / Eduardo Rodrigues Pessoa. – 2021.  
57 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.  
Coorientação: Prof. Dr. Fábio Roger Vasconcelos.
1. Criopreservação. 2. Plasma seminal. 3. Metabólica. 4. Touros. 5. Guzerá. I. Título.
- CDD 636.08
-

EDUARDO RODRIGUES PESSOA

PERFIL METABOLÔMICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS GUZERÁ (*BOS TAURUS INDICUS*) COM DIFERENTES PARÂMETROS DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia. Área de Concentração: Reprodução Animal.

Aprovado em 15/04/2021

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Leda Maria Costa Pereira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Dra. Ana Luiza Malhado Cazaux De Souza Velho  
Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Aos meus pais, Alice e Edmilson, às minhas irmãs, meus amigos e a todos que me ajudaram nessa caminhada.

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

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que até aqui me ajudou e me manteve de pé diante das dificuldades, nunca me deixando faltar esperanças.

À Universidade Federal do Ceará, por todos os anos maravilhosos proporcionados e pelas inúmeras oportunidades de aprendizados oferecidas.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos meus pais, Maria Alice Rodrigues Pessoa e Edmilson Barreto Pessoa, que nunca me deixaram faltar nada. Que sempre fizeram das tripas coração para que seus filhos tivessem as melhores oportunidades possíveis. Principalmente minha mãe, exemplo de mãe, esposa e amiga. Personificação de amor na minha vida. Se hoje em dia eu sou a pessoa que sou e tenho um coração bom, foi por causa da senhora. Sempre me ensinando a ser humilde, ético, grato e principalmente amando meus próximos. Obrigado por tudo. Eu te amo do fundo do meu coração!

Ao meu orientador Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura, por sua orientação, paciência e confiança durante boa parte do mestrado. Ao meu coorientador Dr. Fábio Roger Vasconcelos pela confiança e pelo apoio dado em todo momento, bem como todos os ensinamentos repassados durante esse período.

Ao restante dos membros da minha banca por terem tido disponibilidade e paciência para me guiar nesse caminho: Dra. Ana Luiza Cazaux e Dra. Leda Maria Costa Pereira. Muito obrigado!

A todos meus professores tanto do Departamento de Zootecnia como de outros departamentos pela confiança, competência, paciência e ensinamentos durante todo o mestrado.

Às minhas irmãs, Andréa e Alexandra Pessoa, por sempre me apoiar e me motivar a ir além. Obrigado por existirem!

Ao Jhonatan Apoliano, que me auxiliou durante boa parte desse processo, sendo compreensível, me dando motivação e me apoiando em cada decisão tomada. Muito obrigado!

A todos meus amigos que me auxiliaram, diminuindo a tensão da vida, compartilhando momentos bons e que não deixaram eu perder o ânimo durante a caminhada. Agradecimento especial ao Rafael Rodrigues e Yuri Duarte, que não importa a distância ou o tempo, sempre estão acompanhando meus passos e celebrando minhas vitórias.

À minha rede de apoio diário, que me sustenta a cada dia e faz a caminhada se tornar mais leve: Beatriz Fernandes, Bruno Varela, Izabella Morais, Mario Neto e Rodrigo Marques.

A todos meus companheiros do Laboratório de Fisiologia Animal que durante todos esses anos, me ajudaram, me motivaram e me acolheram com muito carinho: Bruna Félix, Iuri Magalhães, Nhaira Maia, Ylana Galiza. Um agradecimento especial à Kamila Sousa, pelos conselhos diários e por estar sempre disponível durante essa jornada.

E a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para minha formação. Muito obrigado!

## RESUMO

O plasma seminal, além de ser um importante meio carreador dos espermatozoides ejaculados, relaciona-se com diversos metabólitos que exercem significativo papel em vários eventos biológicos e têm sido vinculados a possíveis biomarcadores, auxiliando a prever o potencial reprodutivo de animais selecionados. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar os metabólitos do plasma seminal de touros *Bos taurus indicus* da raça Guzerá e suas associações com a congelabilidade do sêmen. O sêmen de nove touros adultos foi colhido por eletroejaculação e, em seguida, foi realizado o exame andrológico e a criopreservação. Posteriormente, o sêmen foi descongelado e os parâmetros seminais foram avaliados pelo CASA. As amostras do plasma seminal dos touros foram preparadas e, posteriormente, analisadas com a utilização de cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM) e análises multivariadas e univariadas dos dados obtidos. Os metabólitos do plasma seminal e as suas respectivas vias foram identificados por bioinformática a partir dos programas Xcalibur e Cytoscape com o plug-in Metscape e da plataforma MetaboAnalyst. Sessenta e dois metabólitos foram identificados no plasma seminal dos touros. O 1,3-Dioxan-5-ol, ácido esteárico, miristato de colestera, ácido 2-etilheptanoico e isobutilamina foram os metabólitos mais abundantes enquanto que o ácido heptadecanoico, pirrolidina, ácido não-adecanoico, 1-etil-1-nitrosourea e o lactato de etila foram os metabólitos menos abundantes no plasma seminal. A análise estatística multivariada indicou uma separação distinta entre os touros de alta e baixa congelabilidade. Os metabólitos com maior pontuação de importância variável na projeção ( $VIP > 1,0$ ) incluíram o ácido propanoico, ribose, glicina, ácido heptadecanoico e ácido undecanoico. Entre os compostos, o ácido propanoico ( $VIP = 3,5$ ) e a ribose ( $VIP = 2,3$ ) foram mais abundantes no grupo de alta congelabilidade (AC) do que no grupo de baixa congelabilidade (BC). A análise do teste t sugeriu que a concentração de ribose foi a única significativa ( $P = 0,014$ ). Este metabólito pode influenciar na redução do estresse oxidativo, na reparação de danos ao DNA e na prevenção da apoptose celular, além de servir como possível fonte de energia para o organismo. Desse modo, a ribose pode ser considerada um potencial biomarcador de congelabilidade seminal em touros. Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a conduzir uma avaliação dos metabólitos no plasma seminal de touros da raça Guzerá relacionados com diferentes fenótipos de congelabilidade. As descobertas deste estudo servirão de auxílio para o desenvolvimento de novas pesquisas e de uma melhor compreensão sobre os mecanismos de criopreservação espermática.



**Palavras-chave:** Criopreservação. Plasma seminal. Metabolômica. Touros. Guzerá.

## ABSTRACT

Seminal plasma, in addition to being an important carrier medium for ejaculated sperm, is connected to several metabolites that play a significant role in many biological events and have been linked to possible biomarkers, helping to predict the reproductive potential of selected animals. The present study aimed to evaluate the seminal plasma metabolites of *Bos taurus indicus* bulls of the Guzerá breed and their associations with semen freezability. Semen from nine adult bulls was collected by electroejaculation, followed by andrological examination and cryopreservation. Afterwards, the semen was thawed and the seminal parameters were evaluated by CASA. Seminal plasma samples from bulls were prepared and then analyzed using gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS) and multivariate and univariate analyzes. The seminal plasma metabolites and their respective pathways were identified by bioinformatics from Xcalibur and Cytoscape programs and the MetaboAnalyst platform. Sixty-two metabolites were identified in the seminal plasma of the bulls. 1,3-Dioxan-5-ol, stearic acid, cholesteryl myristate, 2-ethylheptanoic acid and isobutylamine were the most abundant metabolites, while heptadecanoic acid, pyrrolidine, nonadecanoic acid, 1-ethyl-1-nitrosourea and ethyl lactate were the least abundant metabolites in the seminal plasma. The multivariate statistical analysis indicated a distinct separation between high and low freezability bulls. The metabolites with the highest score of variable importance in the projection (VIP > 1.0) included propanoic acid, ribose, glycine, heptadecanoic acid and undecanoic acid. Among the compounds, propanoic acid (VIP = 3.5) and ribose (VIP = 2.3) were more abundant in the high freezability group (HF) than in the low freezability group (LF). The t-test analysis suggested that only the concentration of ribose was significant (P = 0.014). This metabolite can influence the reduction of oxidative stress, the repair of DNA damage and the prevention of cellular apoptosis, in addition to serving as a possible source of energy for the body. Thus, ribose can be considered a biomarker of seminal freezability in bulls. As far as it is known, this is the first study to conduct an evaluation of the metabolites in the seminal plasma of Guzerá bulls related to different freezability phenotypes. The findings of this study will serve to assist the development of new research and a better understanding of the mechanisms of sperm cryopreservation.

**Keywords:** Cryopreservation. Seminal plasma. Metabolomics. Bulls. Guzerá.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Membrana plasmática do espermatozoide ..... 23
- Figura 2 - Cromatograma GC-MS representativo do plasma seminal de touros..... 31
- Figura 3 - Número de metabólitos seminais de acordo com as classes químicas. Os metabólitos identificados foram categorizados de acordo com as classes químicas, definidas como aminoácidos, peptídeos e análogos; ácidos carboxílicos e derivados; ácidos graxos e seus conjugados; carboidratos e seus conjugados; esteroides e derivados de esteróides e outros compostos orgânicos..... 34
- Figura 4 - Abundância dos metabólitos mais e menos predominantes no plasma seminal de touros. (A) Os cinco metabólitos mais abundantes foram 1,3-Dioxan-5-ol, ácido octadecanóico, miristato de colesterila, ácido 2-etilheptanóico e isobutilamina. (B) Os metabólitos com menos abundância foram o ácido heptadecanóico, pirrolidina, ácido não-adecanóico, 1-etil-1-nitrosourea e o lactato de etila..... 35
- Figura 5 - Pontuações de PLS-DA associadas aos metabólitos identificados através de GC-MS/MS no plasma seminal de touros de alta (AC) e baixa (BC) congelabilidade do semen..... 36
- Figura 6 - Escores VIP relacionados aos metabólitos do plasma seminal de touros de alta (AC) e baixa congelabilidade (BC). O mapa de calor com os quadrados vermelhos e verdes indica a concentração alta ou baixa, respectivamente, do metabólito correspondente nos touros de AC e BC. A pontuação VIP foi baseada no modelo PLS-DA e considerou-se como determinantes para os fenótipos AC e BC os metabólitos com  $VIP > 1,0$ ... 36
- Figura 7 - *Box plot* da abundância dos metabólitos identificados no plasma seminal de touros e que obtiveram VIP escore  $> 1,0$ . Ácido propanóico (A), ribose (B), glicina (C), ácido heptadecanóico (D) e ácido undecanóico (E)..... 37

Figura 8 - Correlações de Pearson entre os metabólitos identificados no plasma seminal de touros. (A) Mapa de calor das correlações de Pearson entre os metabólitos. (B) Matriz de correlação das concentrações dos metabólitos no plasma seminal (valor de P); caixas destacadas em amarelo representam  $P < 0,05$ ..... 38

Figura 9 - Vias metabólicas associadas às moléculas seminais mais abundantes (ácido esteárico) e com maiores pontuações VIP (Ácido propanóico, ribose e glicina), de acordo com a plataforma MetScape, com o *plug-in* Cytoscape. (A) ácido octadecanóico, (B) ácido propanóico, (C) glicina e (D) ribose. Os metabólitos são mostrados em hexágonos vermelhos. Quadrado cinza: Nó de reação com ID de reação; Hexágono vermelho claro: nó composto; Quadrado verde: nó da enzima; Círculo azul: nó do gene..... 40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Composição do plasma seminal de touro, carneiro, bode e búfalo (mg/dL). 19
- Tabela 2 - Características ponderais e de sêmen pré-criopreservação (média ± EPM) em grupos de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen. Não houve diferença significativa para os parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ). 26
- Tabela 3 - Características seminais pós-criopreservação (média ± EPM), avaliadas pelo CASA, de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen. MOT = espermatozoides móveis; NORM = espermatozoides morfolologicamente normais; DM = defeitos espermático maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; ESTATIC = espermatozoides estáticos; NPROG = espermatozoides móveis não progressivos; PROG = espermatozoides móveis progressivos; RAPID = espermatozoides rápidos; MED = espermatozoides médios; LENT = espermatozoides lentos; VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória. Para cada parâmetro, na mesma linha, letras diferentes representam variações significativas ( $p < 0,05$ )..... 27
- Tabela 4 - Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM classificados com base nas classes químicas e identificados de acordo com os tempos de retenção e abundância (%). 32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Maior que
%	Porcentagem
µl	Microlitro
°C	Graus célsius
AC	Alta congelabilidade
ADP	Adenosina difosfato
AEBSF	<i>(4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride), pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin and aprotinin</i>
AF	Alta fertilidade
AGS	Ácidos graxos saturados
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BC	Baixa congelabilidade
BF	Baixa fertilidade
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CASA	Análise de sêmen assistida por computador
CG-EM	Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrometria de massas
G	Constante gravitacional
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HF	High Freezability
HMDB	<i>The Human Metabolome Database</i>
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto
LF	Low Freezability (LF)
LMWF	Frações de baixo peso molecular
m/z	Razão massa/carga
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Micromolar
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
PARP	Poli-ADP-ribose polimerase
PPi	Pirofosfato inorgânico
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
PS	Plasma seminal
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
seg	Segundos
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
uma	Unidade de Massa Atômica
VIP	Importância da Variável na Projeção

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Plasma seminal</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Metabolômica e metabólitos</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.1</b>	<i>Metabólitos associados à membrana espermática</i> .....	<b>21</b>
<b>2.2.2</b>	<i>Metabólitos associadas à capacitação e reação acrossômica</i> .....	<b>23</b>
<b>2.2.3</b>	<i>Metabólitos associados ao metabolismo energético</i> .....	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Criopreservação seminal</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenho experimental</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Coleta de sêmen e análises pré-criopreservação</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Criopreservação</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>Análises pós-criopreservação</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Preparação das amostras para as análises de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Análises de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise das redes metabólicas</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Metaboloma do plasma seminal de touros</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Classe química dos metabólitos</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Predominância dos metabólitos no plasma seminal de touros</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Associações entre os metabólitos e a congelabilidade do plasma seminal dos touros</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5</b>	<b>Redes metabólicas</b> .....	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>



<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
--------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

O sêmen mamífero é um composto líquido que contém espermatozoides e secreções dos órgãos acessórios e trato genital masculino (Hafez; Hafez, 2004). A porção fluida deste composto, que é conhecida como plasma seminal (PS), é constituída por uma mistura de secreções epididimárias, testiculares e secreções das glândulas acessórias (Juyena; Stelletta, 2012). Além de ser um importante meio carreador dos espermatozoides ejaculados, o PS é composto por diversos metabólitos, sejam eles carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, dentre outros. É sabido que esses metabólitos exercem papel significativo em diversos eventos biológicos e têm sido vinculados a possíveis biomarcadores, auxiliando na identificação do potencial reprodutivo de animais selecionados (Oliver et al., 1998; Fiehn, 2001, 2002; Dunn et al., 2011). Dessa forma, diversos estudos, por meio de técnicas metabolômicas, têm sido realizados com o objetivo de compreender a função e a participação dessas moléculas nas diversas vias metabólicas da reprodução. Esses estudos se mostram muito promissores, pois permitem tanto a identificação quanto quantificação de metabólitos associados a um estado fisiológico, bem como alguma patologia ou defeito reprodutivo do indivíduo (Hollywood; Brison; Goodacre, 2006; Patti; Yanes; Siuzdak, 2012).

Recentes pesquisas têm avaliado a relação entre os metabólitos e técnicas de criopreservação. A criopreservação seminal é uma biotécnica reprodutiva importante, tendo em vista que promove conservação e disseminação dos genótipos masculinos de boa qualidade, por meio da inseminação artificial (IA), aperfeiçoando, assim, a produção animal moderna. No entanto, devido a esse processo de criopreservação, os espermatozoides sofrem modificações moleculares que causam efeitos nocivos na fisiologia do esperma e conseqüentemente, perdas para a produção animal. Dentre essas modificações, podemos observar o estresse oxidativo, danos à membrana, fragmentação de DNA, dentre outros (O'connell; McClure. Lewis, 2002). Logo, é possível dizer que assim como alguns componentes do plasma seminal têm influência positiva na criotolerância espermática, outros componentes apresentam efeitos negativos.

Embora os estudos utilizando ferramentas metabolômicas estejam sendo cada vez mais empregados para pesquisar a fertilidade, congelabilidade e outros aspectos da reprodução nos homens e animais (Kumar et al., 2015; Gilany *et al.*, 2014; Velho et al., 2018; Menezes et al., 2019), ainda existe limitado número de estudos voltados para animais de produção, especialmente relacionados à congelabilidade seminal. Desta forma, o presente estudo objetivou a utilização de cromatografia gasosa aliado à espectrometria de massas

(CG-EM) para avaliar os metabólitos do plasma seminal de touros *Bos taurus indicus* da raça Guzerá e suas associações com a congelabilidade do sêmen.

## 2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 Plasma seminal

O plasma seminal é um meio fluido complexo que contém espermatozoides suspensos e secreções das glândulas acessórias e do trato genital masculino, atuando, regularmente, como meio carreador que facilita a sobrevivência e o transporte do gameta masculino (Hafez; Hafez, 2004; Juyena; Stelletta, 2012). Além disso, estudos sugerem que os componentes do plasma seminal atuam em outros diversos eventos importantes para a reprodução animal, como na função espermática e no desenvolvimento do embrião no trato reprodutivo feminino (Tummaruk et al, 2000). A constituição do plasma seminal é definida pelo tamanho, capacidade de armazenamento e produção de secreção de diferentes órgãos do trato reprodutor masculino, podendo variar entre espécies (Mann, 1964; Killian; Chapman. Rogowski, 1993). Estes constituintes podem ser açúcares, íons, compostos nitrogenados e orgânicos, dentre outras substâncias (Juyena; Stelletta, 2012; Tabela 1).

Nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de entender melhor as funções do plasma seminal e de seus componentes. Desse modo, autores observaram que o plasma seminal está envolvido com a proteção dos espermatozoides da fagocitose, regulação do transporte e eliminação do esperma, ativação e aumento da motilidade dos espermatozoides e auxílio nas interações espermatozoides-óvulo (Desnoyers; Manjunath, 1992; Alghamdi; Foster; Troedsson, 2004; Troedsson et al, 2005; Souza et al, 2008). Pesquisadores também relataram que a adição do plasma seminal, ou de seus componentes, no sêmen pós-descongelado aumentou a captação de oxigênio, a motilidade dos espermatozoides e os parâmetros gerais de qualidade seminal (White; Goh; Voglmayr, 1987; Maxwell et al, 2007). No entanto, também pode-se observar que houve uma piora significativa na motilidade pós-descongelamento de espermatozoides dialisadas com frações de baixo peso molecular (LMWF) do plasma seminal (Garcia; Graham, 1987).

Pesquisas realizadas têm se concentrado principalmente nas proteínas seminais e nas suas interações com os espermatozoides e com a fertilidade masculina (Moura et al., 2006; Moura; Chapman; Killian, 2007). Porém, novas técnicas, como a utilização de cromatografia gasosa e líquida acoplada à espectrometria de massa, vêm possibilitando uma maior análise e entendimento sobre os metabólitos presentes no plasma seminal. (Zhang et al., 2014; Velho et al., 2018).

Tabela 1. Composição do plasma seminal de touro, carneiro, bode e búfalo (mg/dL)

Content	Bull <sup>a</sup>	Ram <sup>b</sup>	Goat <sup>b</sup>	Buffalo <sup>c</sup>
Fructose	150–900	150–600	875	368–815
Glucose	300	0.9–1.6	4.8–8.8	13–52
Citric acid	340–1150	110–260	...	440–444
Total proteins, g/dL	3.8	2.30–2.50	0.77–1.48	...
Total lipids	29	254–396	...	150–175
Phospholipids	149.1	...	57	6.9–59.4
Cholesterol	312.16	...	...	117.83
Glutamic acid	1.0–8.0	4.5–5.2	...	4.28
Na	140–280	120–258	60–183	260–278
K	80–210	50–140	76–255	192–205
Ca	35–60	6–15	5–15	30
P	9	4.8–12.0	...	8–9
Cl	110–290	86	82–215	303–347
Mg	7–12	2–13	1–4	4.3–5.7
Zn	2.6–3.7	56–179	...	0.80–1.17
Testosterone, pg/mL	210–1310	25–375	...	970
Estrogen, pg/mL	20–166	...	...	43.67
Prostaglandins, ng/mL	5–10	500–20 000	...	...
ALP	246 BU/dL	14 895–40 818 mU/mL	...	315 BU/dL
AST	345–623 SFU/mL	190–256 mU/mL	...	166 units/mL
ALT	15.0–18.3 SFU/mL	39–148 mU/mL	...	34 units/mL
LDH	1909 units/mL	968–1697 mU/mL	...	1621 BBU/mL

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate amino transferase; BBU, Berger-Broida units; BU, Bodansky units; LDH, lactate dehydrogenase; SFU, Sigma Frankel units

<sup>a</sup> Pineda, 2003; Andrabi, 2009.

<sup>b</sup> Pineda, 2003; Gündoğun, 2006; Andrabi, 2009.

<sup>c</sup> Singh et al, 1969; Chauhan and Srivastava, 1973; Javed et al, 2000; Andrabi, 2009.

Fonte: Adaptado de Juyena e Stelletta (2012).

## 2.2 Metabolômica e metabólitos

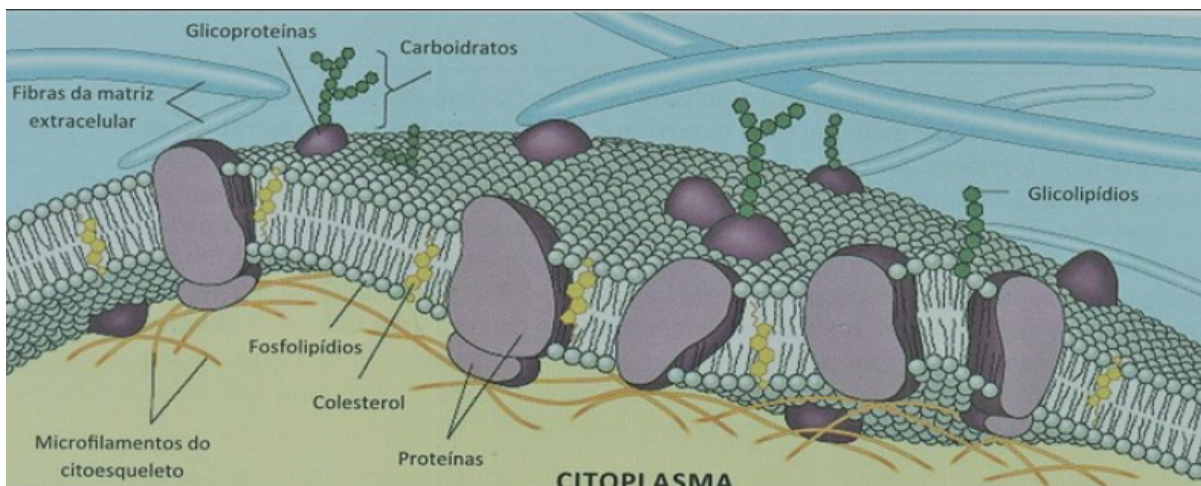
Os metabólitos são produtos químicos orgânicos e inorgânicos de baixo peso molecular, dentre eles aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos e esteroides, entre outros. Logo, essas pequenas moléculas são encontradas em todos os sistemas biológicos, uma vez que constituem a base de todas estruturas bioquímicas (Dunn et al., 2011). Ademais, os metabólitos têm sido descritos como potenciais biomarcadores da fertilidade masculina e congelabilidade espermática (Velho et al., 2018; Ugur et al., 2020). Com o objetivo de obter uma melhor compreensão sobre essas moléculas e suas funções nas vias metabólicas da reprodução animal, cada vez mais pesquisadores têm utilizado a metabolômica.

A metabolômica é estabelecida como a identificação e quantificação não direcionada de todos os produtos finais de baixo peso molecular do metabolismo, os metabólitos (Nicholson; Lindon; Holmes, 1999). Essa técnica pode ser aliada a outros métodos “ômicos”, como proteômica, lipidômica, genômica e transcriptômica (Chen et al., 2012; Long, 2020). Em estudo recente, pesquisadores utilizaram cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM) para determinar o metaboloma do plasma seminal de touros com diferentes escores de fertilidades e identificar metabólitos que se apresentam como potenciais marcadores de fertilidade. Os autores identificaram 63 metabólitos no plasma seminal, em que a frutose, ácido cítrico, ácido láctico, ureia e ácido fosfórico foram os metabólitos predominantes no PS de touros. Adicionalmente, a frutose e o ácido 2-oxoglutárico foram considerados potenciais biomarcadores de fertilidade de touros (Velho et al., 2018). A frutose é uma importante fonte de energia para o espermatozoide de touro, já o ácido 2-oxoglutárico é formado a partir do ácido glutárico e não possui função definida no sêmen, porém estudos revelam que no plasma seminal de homens com astenozoospermia há uma maior concentração deste metabólito do que em homens saudáveis (Mann, 1946; Zhang et al., 2015). Em outro estudo, foi observada maior concentração de triptamina, taurina e leucina e menor concentração de citrato e isoleucina no plasma seminal de touros de alta fertilidade (Kumar et al., 2015). Com isso, sabemos como os metabólitos são importantes para variados eventos reprodutivos como a capacitação, reação acrossômica e fertilização.

### ***2.2.1 Metabólitos associados à membrana espermática***

A estrutura básica da membrana plasmática do espermatozoide é semelhante ao modelo mosaico fluido e é formado por duas camadas de lipídios, intercaladas com várias proteínas, que representam pouco mais de 50% do peso da maioria das membranas (Singer; Nicolson, 1972; Amann; Pickett, 1987; Figura 1). As organelas e as componentes intracelulares são mantidas unidas por essa membrana que circunda toda a célula. A integridade estrutural é responsabilidade dos lipídios, já as proteínas são importantes para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a fixação do mesmo à membrana plasmática do óvulo no momento da fertilização. Os carboidratos geralmente são encontrados apenas no lado extracelular das membranas plasmáticas e tendem a atrair e se ligar fracamente proteínas ou glicoproteínas no meio ao redor do espermatozoide (Amann; Pickett, 1987).

Figura 1. Membrana plasmática do espermatozoide



Fonte: Henry; Echeverri, 2013.

A composição de lipídios da membrana plasmática pode variar entre diferentes espécies mamíferas, porém, no geral, contém aproximadamente 70% de fosfolípidios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (Mann; Lutwak-Mann, 1981). Além disso, estudos mostraram que, em carneiros e javalis, mudanças na concentração de fosfolípidios podem afetar a estrutura da membrana e a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino (Grogan; Mayer; Sikes, 1966; Scott; Voglmayr; Setchell, 1967).

O ácido palmítico (16:0), ou ácido hexadecanoico, possui um alto teor nos fosfolípidios extraídos dos espermatozoides testiculares, enquanto que nos fosfolípidios dos espermatozoides ejaculados, o teor de ácido palmítico diminui e o de ácido mirístico (14:0) aumenta. Essas diferenças de aumento e/ou a diminuição de ácidos graxos influencia as características das membranas lipoproteicas dos espermatozoides e podem estar relacionadas à permeabilidade dessas, esclarecendo o porquê dos espermatozoides testiculares serem mais resistentes ao “choque de frio” da criopreservação do que as células ejaculadas (Scott; Voglmayr; Setchell, 1967; Voglmayr et al. 1967). Estudos mais recentes relataram que os espermatozoides defeituosos continham esse metabólito em excesso e que essa má qualidade dos espermatozoides frequentemente se correlacionava com altos níveis de ácidos graxos saturados (AGS) na membrana espermática. Isso ocorre porque a membrana espermática se torna mais rígida devido aos AGS de cadeia longa, podendo obstruir a fusão espermatozoide-ovócito (Khosrowbeygi; Zarghami, 2007; Garcia et al., 2011). Da mesma forma, relata-se que os espermatozoides e o plasma seminal de homens com astenozoospermia exibem aumento nos níveis de ácido palmítico, oleico (C18:1 n-9),

mirístico e esteárico (18:0), podendo causar um possível distúrbio no metabolismo da membrana espermática (Aksoy et al., 2006; Tavalani et al., 2007; Tang et al., 2017).

### **2.2.2 *Metabólitos associadas à capacitação e reação acrossômica***

Pode-se entender a capacitação espermática como uma série de mudanças bioquímicas e funcionais ocorridas no trato reprodutivo feminino que tornam o espermatozoide capacitado para a fertilização. Uma vez no ovário, os espermatozoides capacitados podem se ligar à zona pelúcida do oócito (Dunbar et al., 1994; Tulsiani, Yoshida-Komiya; Araki, 1997). Já a reação acrossômica é um processo extremamente necessário para que ocorra a fecundação. Neste contexto, a reação acrossômica libera uma variedade de enzimas hidrolíticas e proteolíticas essenciais para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito (Patrat; Serres; Jouannet, 2000).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório encontrado no sistema nervoso de variadas espécies. É o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central dos vertebrados e estima-se que 20–50% de todas as sinapses no cérebro dos mamíferos são GABAérgicas. (Roberts; Frankel, 1950; Sieghart, 1992; Chebib; Johnston, 1999). Esse metabólito induz a capacitação espermática por meio de um mecanismo intracelular dependente do influxo de cálcio e do acúmulo de CAMP. Além disso, o efeito do GABA parece ser mediado pelo receptor GABA A; portanto, sugere-se a existência de uma ligação entre a ativação de um receptor GABA A e um canal de  $Ca^{2+}$  envolvido no desenvolvimento da reação acrossômica (Ritta et al., 2004; Puente et al., 2011). O GABA induz a capacitação de espermatozoides de carneiros, ratos e touros e reação acrossômica em bovinos (de las Heras; Valcarcel; Perez, 1997; Ritta et al., 2004; Jin et al., 2009; Puente; Tartaglione; Ritta, 2011). Além disso, pesquisas recentes identificaram esse ácido no plasma seminal e espermatozoides de touros (Velho et al., 2018; Menezes et al., 2019).

O lactato é a base conjugada do ácido láctico, resultante da desprotonação do grupo carboxi. Este metabólito é uma importante fonte de energia para o espermatozoide de humanos, touros e cavalos (Piomboni et al., 2011; Visconti, 2012; Darr et al., 2016). Uma pesquisa recente identificou uma maior concentração de lactato no espermatozoide de touros de alta fertilidade (AF) em comparação com touros de baixa fertilidade (BF) (Menezes et al., 2019). Como é sabido que as mitocôndrias dos espermatozoides compensam a baixa energia produzindo lactato, autores sugerem que touros de AF utilizam de forma mais eficiente a



glicólise anaeróbica do que touros de BF (Du Plessis et al., 2015; Paventi et al., 2015). O dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), gerado pela glicose-6-fosfato desidrogenase, promovem a capacitação em espermatozoides humanos, podendo atuar como uma coenzima espermática responsável por produzir O<sub>2</sub>. (Aitken et al., 1995; de Lamirande et al., 1998). Dessa forma, a lactato desidrogenase pode participar da conversão do piruvato em lactato para obter equivalentes redutores intracelulares a serem usados para a capacitação espermática (O'flaherty; Beorlegui; Beconi; 2002; Odet et al., 2011; Menezes et al., 2019). Outro estudo mostrou que a adição da lactato desidrogenase A humana ao citoplasma restaurou a capacitação espermática (Tang et al., 2013). De acordo com esses dados, é importante ressaltar também, que a indução *in vitro* da capacitação e reação acrossômica também causaram um aumento na atividade da lactato desidrogenase (Zhu et al., 2018).

Outro metabólito que também se sugere estar envolvido na reação acrossômica é o ácido nonanóico (C9: 0), que é um ácido graxo com nove átomos de carbono e também é conhecido como ácido pelargônico. O ácido nonanoico e um receptor conhecido do mesmo, o OR51E1, foram detectados, respectivamente, no espermatozoide de touros e na capa acrossomal de espermatozoides humanos. Dessa forma supõe-se que o ácido nonanoico contribua para a maturação dos espermatozoides e que esteja envolvido na reação acrossômica, auxiliando a fosforilação da proteína tirosina durante a capacitação do esperma (Adipietro; Mainland; Matsunami, 2012; Flegel *et l.*, 2016; Hu et al., 2018; Menezes et al., 2019).

### **2.2.3 Metabólitos associados ao metabolismo energético**

Existem também metabólitos utilizados como fonte de energia para as células espermáticas (Mann; White, 1957; Paventi et al., 2015; Velho et al., 2018) como a frutose, o ácido láctico e o ácido cítrico. A frutose é um monossacarídeo de seis carbonos, isômero da glicose e é a principal fonte de energia para os espermatozoides de touros (Mann, 1946; Liberda et al., 2001; Velho et al., 2018). Além de ser encontrada no espermatozoide e no plasma seminal de touros, a frutose tem sido observada no fluido seminal de caprinos, ovinos e humanos (Matsuoka et al., 2006, Jayaraman et al., 2014, Sousa et al., 2020). Além disso, o ácido láctico, convertido da frutose pela via da frutólise, disponibiliza energia para a motilidade e sobrevivência anaeróbia dos espermatozoides (Mann, 1946).

O ácido cítrico é um metabólito importante na via de todos os organismos aeróbios. É o principal ácido orgânico no plasma seminal de touros, carneiros e cabras (Humphrey & Mann, 1949; Juyena; Stelletta, 2012), fonte de energia para os espermatozoides e pode ser encontrado no sêmen de outras espécies de mamíferos como homem e javali (Costello; Franklin, 1991; Kamp; Lauterwein, 1995; Jayaraman et al., 2014). Além disso, o ácido cítrico possui potenciais efeitos sobre a capacitação espermática e acrossômica (Kumar et al., 2015).

Outro metabólito que contribui para o metabolismo energético da célula espermática é o ácido fosfórico, que é produzido pela quebra de uma molécula de pirofosfato inorgânico (PPi). Nesse processo há a liberação de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), que pode ser utilizada para a motilidade espermática e função acrossomal (Wallach et al., 1980; Lundin; Baltscheffsky; Ronne, 1991; Yi et al., 2012). O ácido fosfórico foi identificado em estudos recentes como um dos metabólitos mais abundantes no espermatozoide e no plasma seminal de touros (Velho et al., 2018; Menezes et al., 2019)

### **2.3 Criopreservação seminal**

Recentes pesquisas têm avaliado a relação entre os metabólitos e as técnicas de criopreservação. A criopreservação seminal é uma biotécnica reprodutiva importante, tendo em vista que promove conservação e disseminação dos genótipos masculinos de boa qualidade, por meio da inseminação artificial (IA), aperfeiçoando, assim, a produção animal moderna. O emprego dessa biotécnica proporciona rápida difusão do material genético de qualidade mesmo entre diferentes regiões e/ou países; reduz os custos do produtor com transporte e alimentação dos reprodutores; potencializa, mesmo depois de morto ou incapacitado de realizar a monta, o uso de reprodutores considerados melhoradores de rebanho; e minimiza o risco de difusão de doenças sexualmente transmissíveis (Traldi, 1994). No entanto, devido a esse processo de criopreservação, os espermatozoides sofrem modificações moleculares que causam efeitos nocivos na fisiologia do esperma e conseqüentemente, perdas para a produção animal. Dentre essas modificações, podemos observar estresse oxidativo, danos à membrana, fragmentação de DNA dentre outros (O'connell; McClure. Lewis, 2002).

É possível dizer que assim como alguns componentes do plasma seminal têm influências positivas na criotolerância espermática, outros componentes apresentam efeitos negativos. Sangeeta et al. (2015) sugeriram que os aminoácidos L-glutamina e L-prolina

diminuem a peroxidação lipídica e atuam contra lesões causadas por radicais livres, protegendo, deste modo, os espermatozoides ovinos durante a criopreservação (Sangeeta et al., 2015). Estudo realizado por Srivastava et al. (2012) demonstrou que o “sequestro” da proteína Binder of Sperm Proteins 1 (PDC 109) proporciona melhora significativa nos valores dos parâmetros seminais pré e pós-descongelamento de espermatozoides bovinos criopreservados. Em pesquisa mais recente (Ugur et al., 2020), foi analisada a hipótese de que os aminoácidos do plasma seminal estão associados com a congelabilidade espermática de touros. Esses autores observaram que a fenilalanina foi mais abundante no grupo dos touros com boa congelabilidade do que no grupo de touros com congelabilidade ruim e essa correlação com a melhoria do processo de criopreservação pode ser atribuída a participação deste aminoácido em diversas reações antioxidantes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho experimental

No presente estudo, foi utilizado o plasma seminal criopreservado de nove animais da raça Guzerá (Tabela 2), oriundos de uma pesquisa realizada anteriormente (Rêgo et al., 2016). Os animais, originários da Fazenda Canhotinho, situada no município de Quixeramobim no Sertão Central do Ceará, apresentaram motilidade seminal mínima maior que 70%, de acordo com os parâmetros preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Os animais foram separados em grupos de alta e baixa congelabilidade com base na cinética espermática pós-descongelamento (CBRA, 1998. Felipe-Silva et al., 2011; Rêgo et al., 2016;).

**Tabela 2.** Características ponderais e de sêmen pré-criopreservação (média  $\pm$  EPM) em grupos de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen. Não houve diferença significativa para os parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ).

Parâmetros	Grupos de congelamento de sêmen	
	Alta (n = 4)	Baixa (n = 5)
Idade (meses)	27,8 $\pm$ 0,5	29,0 $\pm$ 0,7
Peso corporal (kg)	332,8 $\pm$ 7,5	358,0 $\pm$ 12,3
Motilidade total (%)	77,5 $\pm$ 3,2	80,0 $\pm$ 4,2
Vigor (0 – 5)	4,0 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,5
Espermatozoides normais (%)	89,0 $\pm$ 1,4	92,4 $\pm$ 0,7

#### 3.2 Coleta de sêmen e análises pré-criopreservação

As etapas de colheita, criopreservação e análises pré e pós-congelamento foram realizadas por Rêgo et al. (2016). Resumidamente, o sêmen foi coletado por eletroejaculação (Furman; Ball; Seidel, 1975), uma alíquota de 20  $\mu$ L de amostra seminal de cada touro foi avaliada em microscópio (100 x) quanto à motilidade massa (0 – 5) e outra alíquota passou pelo mesmo procedimento para avaliar a motilidade (%) e vigor (0 – 5). Outra alíquota seminal ainda foi diluída em solução formol-salina (1:200) e utilizada para estimar a concentração espermática, utilizando uma câmara de Neubauer em microscópio (400 x). Posteriormente, três esfregaços contendo sêmen fresco foram utilizados para cada touro e as lâminas foram coradas de acordo com o método eosina-nigrosina de Barth; Oko (1989). Para

a avaliação da morfologia espermática foram contadas duzentas células por lâmina em microscópio (1000 x).

### 3.3 Criopreservação

Para a criopreservação seminal dos nove animais, uma alíquota de 1mL de sêmen foi misturada com 10 µL de um *cocktail* de inibidores de protease, contendo AEBSF (*4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride*), *pepstatin A*, *E-64*, *bestatin*, *leupeptin* and *aprotinin* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para futuras análises dos metabólitos do plasma seminal. O restante do sêmen foi diluído em um meio crioprotetor contendo gema de ovo, lactose, glicerol e antibióticos (Nagase et al., 1964) na quantidade adequada para chegar a uma concentração final de  $30 \times 10^6$  sperm/mL. Posteriormente, o sêmen foi colocado em banho maria a 34 °C durante 10 minutos e depois envasado em palhetas de congelamento de 0,5 mL. As mesmas foram submetidas a uma taxa de resfriamento de -0,55 °C/min até atingir a temperatura de 4° C, sendo mantidas nessa condição por 4 horas. Com isso, as palhetas foram posicionadas a 5 cm acima do nitrogênio líquido, com uma taxa de congelamento de -19,1 °C/min. Ao alcançar a temperatura de -153 °C, as palhetas foram imersas e mantidas no nitrogênio até análises futuras (Rêgo et al., 2016).

### 3.4 Análises pós-criopreservação

Quatro palhetas de sêmen criopreservado de cada touro foram descongeladas em banho maria por 30 seg a 37 °C e utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática e da cinética espermática. Posteriormente, alíquotas de 5µl de sêmen foram submetidas à avaliação em um microscópio de contraste de fases acoplado a uma câmera de vídeo e ao sistema para Computer-assisted semen analysis (CASA), onde foram realizadas análises de motilidade total e progressiva, velocidade real da trajetória espermática, velocidade linear, velocidade média do percurso, linearidade e retilinearidade. Os grupos de alta (motilidade total  $\geq 30$  %) e de baixa (motilidade  $< 30$  %) congelabilidade foram separadas com base na cinética espermática (Tabela 3). Além da cinética espermática, outros parâmetros seminais pós-descongelamento também foram considerados para separação de touros em grupos de alta e baixa congelabilidade, como motilidade progressiva e não-progressiva e porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (Felipe-Silva et al., 2011; Rêgo et al., 2016).

**Tabela 3.** Características seminais pós-criopreservação (média  $\pm$  EPM), avaliadas pelo CASA, de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen. MOT = espermatozoides móveis; NORM = espermatozoides morfológicamente normais; DM = defeitos espermático maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; ESTATIC = espermatozoides estáticos; NPROG = espermatozoides móveis não progressivos; PROG = espermatozoides móveis progressivos; RAPID = espermatozoides rápidos; MED = espermatozoides médios; LENT = espermatozoides lentos; VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória. Para cada parâmetro, na mesma linha, letras diferentes representam variações significativas ( $p < 0,05$ ).

Parâmetros	Grupos de congelamento de sêmen	
	Alta (n = 4)	Baixa (n = 5)
MOT (%)	42,4 $\pm$ 6,4a	11,9 $\pm$ 2,3b
NORM (%)	88,5 $\pm$ 0,7a	63,0 $\pm$ 6,7b
DM (%)	5,3 $\pm$ 0,7b	20,1 $\pm$ 2,9a
Dm (%)	6,3 $\pm$ 0,4b	16,9 $\pm$ 3,9a
NPROG (%)	20,2 $\pm$ 2,9a	8,2 $\pm$ 1,8b
PROG (%)	22,3 $\pm$ 5,0a	5,1 $\pm$ 1,4b
RAPID (%)	24,2 $\pm$ 4,5a	6,1 $\pm$ 1,6b
MED (%)	7,1 $\pm$ 1,4a	1,9 $\pm$ 0,8b
LENT (%)	11,2 $\pm$ 1,6a	5,3 $\pm$ 2,2b
ESTATIC (%)	57,6 $\pm$ 6,4b	86,7 $\pm$ 1,9a
VCL ( $\mu$ /s)	75,6 $\pm$ 0,8a	60,6 $\pm$ 5,7b
VSL ( $\mu$ /s)	40,0 $\pm$ 5,4a	31,8 $\pm$ 3,1b
VAP ( $\mu$ /s)	48,3 $\pm$ 3,7a	39,3 $\pm$ 3,9b

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

Logo após a colheita de sêmen, uma parte do ejaculado destinado a criopreservação foi centrifugada a 700 x g por 15 minutos a 4 °C para separação do plasma seminal e dos espermatozoides, sendo ambos congelados a -20 °C (Rêgo, 2010). A preparação das amostras do plasma seminal dos touros para as análises de CG-EM foi realizada de acordo com o método descrito por Velho et al. (2018), com adaptações. Em resumo, uma alíquota de 50  $\mu$ L de cada amostra foi descongelada e transferida para um microtubo de polipropileno de 1,5 mL. Em seguida, um volume de 75  $\mu$ L de ácido heptadecanoico em 0,2 mg/mL de ribitol e 175  $\mu$ L de metanol foram adicionados aos microtubos. Em seguida, estas soluções foram agitadas com vortex durante 3 minutos e depois centrifugadas (14000 x g, 4 °C por 15 min). Um volume de 150  $\mu$ L de cada sobrenadante foi transferido para “vials âmbar” de 2 mL e o solvente foi evaporado com auxílio de um SpeedVac. No dia seguinte, foram adicionados 25  $\mu$ L de solução de cloridrato de metoxiamina dissolvido em piridina (20 mg/mL) aos extratos

orgânicos secos. Em seguida, as amostras foram agitadas com vortex durante 3 minutos e incubados em thermomix a 70 °C durante 2 horas. A derivatização foi realizada por meio da adição de 30 µL de *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), agitadas no vortex durante 3 minutos e incubadas novamente em um thermomix a 70 °C durante 1 hora. Logo em seguida, os derivados dos metabólitos foram “vortexados” mais uma vez durante 3 min e transferidos para “vials âmbar” para posterior injeção no EM-CG.

### 3.6 Análises de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM)

As amostras foram analisadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (DBBM-UFC) por meio de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus), um auto injetor (*AOC-20i*) da Shimadzu e a uma coluna capilar Coluna RTX - 5MS (30 m × 0,25 mm i.d. x 0,25 µm). Antes das amostras já preparadas, um “vial” apenas com a solução derivatizante (controle negativo) foi analisado no CG-MS para facilitar a distinção entre picos provenientes da solução derivatizante e da própria amostra. Posteriormente, 1 µL de mistura derivatizada foi posicionada no auto injetor com a entrada aquecida a 250 °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<sup>-1</sup>, com um fluxo constante. A linha de transferência do espectrômetro e a fonte de íons foram aquecidos a 250 °C e 230 °C, respectivamente. O forno do cromatógrafo gasoso foi programado 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 0.3 *m/z*). O tempo de atraso do solvente foi de 5 minutos.

Os compostos foram identificados baseados na comparação dos seus tempos de retenção, no programa XCalibur com a biblioteca NIST Mass Spectral Search Program (Mass Spectral Library, Versão 2.0). Todos os metabólitos identificados foram categorizados de acordo com suas classes químicas com o auxílio da plataforma *The Human Metabolome Database* (HMDB).

### 3.7 Análise Estatística

A análise estatística da abundância dos metabólitos foi realizada utilizando o programa MetaboAnalyst 5.0. Para isso, a matriz de dados gerada foi normalizada pela média, transformada por log e escalonada pela centralização média, o que permitiu a realização das 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 congelabilidade. 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 alta congelabilidade (AC) e baixa congelabilidade (BC). 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).

### 3.8 Análise das redes metabólicas

Por meio da bioinformática foi possível visualizar as redes e vias metabólicas. As vias metabólicas relacionadas a um dos metabólitos mais abundantes encontrados no plasma seminal dos touros (ácido esteárico) e aos metabólitos com pontuações VIP mais altas (ácido propanoico, ribose e glicina) foram analisadas usando o programa computacional Cytoscape com o plug-in Metscape<sup>1</sup>. A identificação dos compostos foi realizada pela Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) (Karnovsky et al., 2012).

---

<sup>1</sup> <http://www.cytoscape.org>

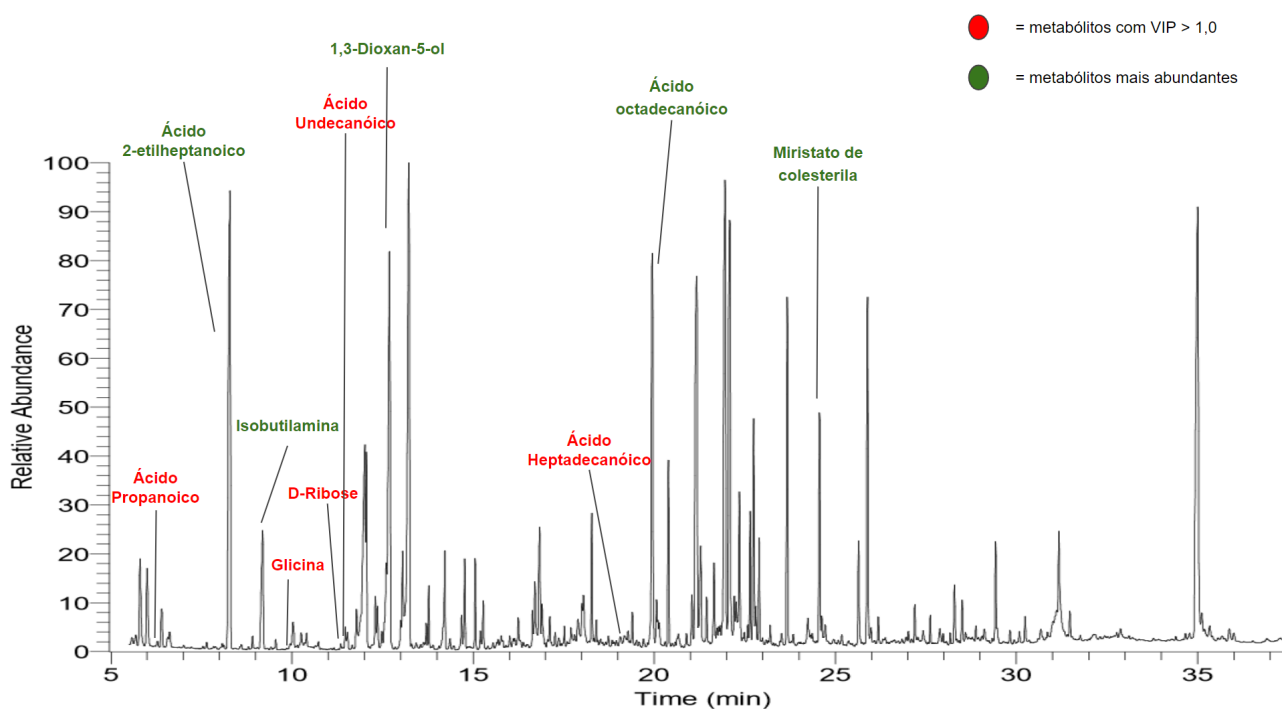


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Metaboloma do plasma seminal de touros

Após a análise do plasma seminal dos touros utilizando a CG-EM, foram identificados e classificados de acordo com suas classes químicas 62 metabólitos. Esses metabólitos foram identificados com o auxílio da biblioteca *NIST Mass Spectral Search Program*. A Tabela 4 apresenta todos os metabólitos identificados, seus tempos de retenção e abundância e na Figura 2 pode-se observar um cromatograma característico de CG do plasma seminal desses animais com a identificação de alguns picos de metabólitos importantes.

**Figura 2.** Cromatograma GC-MS representativo do plasma seminal de touros.



Fonte: Adaptado do programa Xcalibur.

**Tabela 4.** Metabólitos identificados no plasma seminal de touros por meio de CG-EM classificados com base nas classes químicas e identificados de acordo com os tempos de retenção e abundância (%).

Metabólitos e classes químicas	Tempo de Retenção (minutos)	Abundância (%)
<i>Ácidos carboxílicos e derivados</i>		
Ácido propanoico	6,29	0,19

Tianfenicol	6,40	1,14
2,4-diclorofenoxiacetato de isobutila	6,63	0,44
Lactato de etila	8,69	0,00
Mesoxalato dietílico	10,03	1,20
Ácido acético	12,19	0,11
4-Dimetilaminocinamaldeído	12,48	0,69

***Ácidos graxos e conjugados***

Ácido 2-oxobutanoico	7,64	0,21
Ácido 2-etilheptanoico	8,29	8,04
Oxaciclododecano-2-ona	11,40	0,11
Ácido ricinoleico	13,06	1,91
Ácido dodecanoico	13,78	1,31
Ácido nonanoico	14,06	0,06
Ácido decanoico	15,06	0,47
Ácido octanoico	15,20	1,20
Ácido cítrico	16,90	2,31
Ácido pentadecanoico	17,37	0,47
Ácido tetradecanoico	18,73	0,58
Ácido heptadecanoico	19,11	0,04
Ácido azelaico	20,69	0,20
Ácido não adecanoico	20,78	0,04
Hexanodioato de dioctilo	21,65	1,32
Ácido undecanoico	22,65	3,38
Ácido palmítico	23,35	0,05
Ácido octadecanoico	25,89	8,86
Ácido não adecanoico	26,85	0,19

***Aminoácidos, peptídeos e análogos***

Glicil-DL-alanina	5,58	0,58
Glicil-DL-alanina	7,00	0,07
Penicilamina	8,91	0,18
Glicina	9,95	0,07
Treonina	11,09	0,05
DL-treonina	14,68	2,56

***Carboidratos e conjugados de carboidratos***

D-Ribose	11,35	0,07
1,3-Dioxan-5-ol	12,70	15,96
d-Arabinose	14,77	2,25
Xilose	17,52	0,41
1,2:5,6 Dianidrogallactitol	27,98	0,37

***Esteroides e derivados de esteroides***

Enantato de testosterona	20,07	1,96
Miristato de colesterila	23,68	8,47
Acetato de hidrocortisona	27,20	0,84
Beclometasona	27,62	0,75
Colesterol	29,42	2,46
Colest-5-en-3-ol (3 $\beta$ )-, tetradecanoato	34,67	0,17

#### ***Outros Compostos Orgânicos***

Acetona cianohidrina	7,54	0,33
1-etil-1-nitrosourea	8,98	0,01
Isobutilamina	9,19	5,39
Etil butilcarbamato	9,55	0,20
Pirrolidina	10,55	0,04
1-cloropentano	10,64	0,66
Ácido 3,4-diclorobenzoico	11,90	0,30
Benzoato de metila	12,06	2,93
Naftaleno-2,3-diamina	13,00	3,05
Trealose	14,22	2,67
4,5-diamino-6-metil-2-tiopirimidina	18,05	1,50
Pentadecano	19,27	0,38
Hexadecano	19,58	0,12
Ácido giberélico	20,89	0,58
Prodiamine	22,81	1,03
Heptadecano	25,18	0,35
Heneicosano	32,77	0,21
Tetracosano	33,11	0,10
Eicosano	33,20	0,09

#### ***Vitaminas***

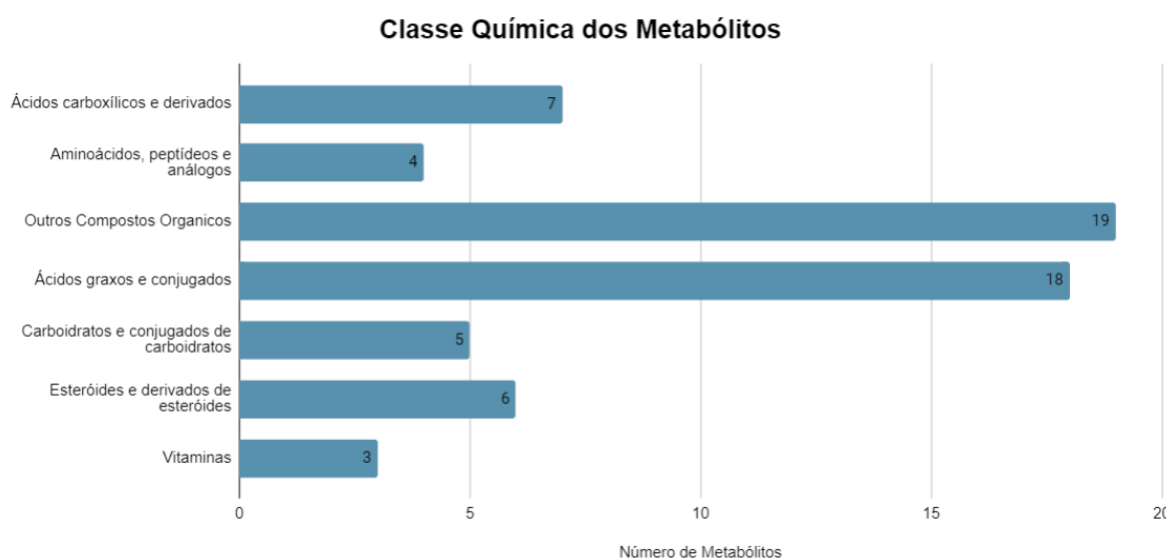
Ácido retinoico, éster metílico	12,60	3,70
Betacaroteno	23,20	0,63
Retinol	23,52	0,35
Ácido retinóico, éster metílico	25,64	2,80

## **4.2 Classe química dos metabólitos**

A classe química dos ácidos graxos e conjugados e dos compostos orgânicos apresentam maiores números de metabólitos no plasma seminal bovino. Nessas classes foram detectadas 18 e 19 compostos, respectivamente. O terceiro maior grupo foi o dos ácidos carboxílicos e derivados, com sete metabólitos identificados, incluindo ácido propanoico e

ácido acético. Com seis metabólitos, temos em quarto lugar as classes os esteroides e derivados de esteroides. Em quinto lugar, temos a classe dos carboidratos e seus conjugados, com 5 metabólitos identificados, incluindo ribose, arabinose e xilose. Foram também identificados quatro aminoácidos, peptídeos e derivados e três vitaminas (Figura 3 e Tabela 4).

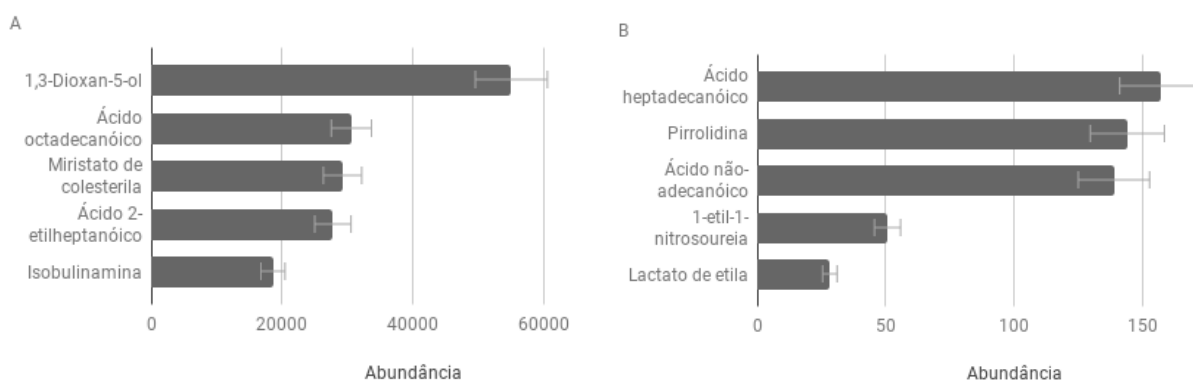
**Figura 3.** Número de metabólitos seminais de acordo com as classes químicas. Os metabólitos identificados foram categorizados de acordo com as classes químicas, definidas como aminoácidos, peptídeos e análogos; ácidos carboxílicos e derivados; ácidos graxos e seus conjugados; carboidratos e seus conjugados; esteroides e derivados de esteroides e outros compostos orgânicos.



### 4.3 Predominância dos metabólitos no plasma seminal de touros

A abundância foi estabelecida pelo programa Xcalibur por meio do valor da área de intensidade do pico dos metabólitos, encontrada no cg. O metabólito mais abundante encontrado no plasma seminal de ambos grupos de touros foi o 1,3-Dioxan-5-ol. Outros metabólitos com grande abundância foram o ácido esteárico, miristato de colessterila, ácido 2-etilheptanoico e isobutilamina (Figura 4A). Enquanto isso, os metabólitos com menos abundância foram o ácido heptadecanoico (padrão interno), pirrolidina, ácido não-adeanoico, 1-etil-1-nitrosourea e o lactato de etila (Figura 4B).

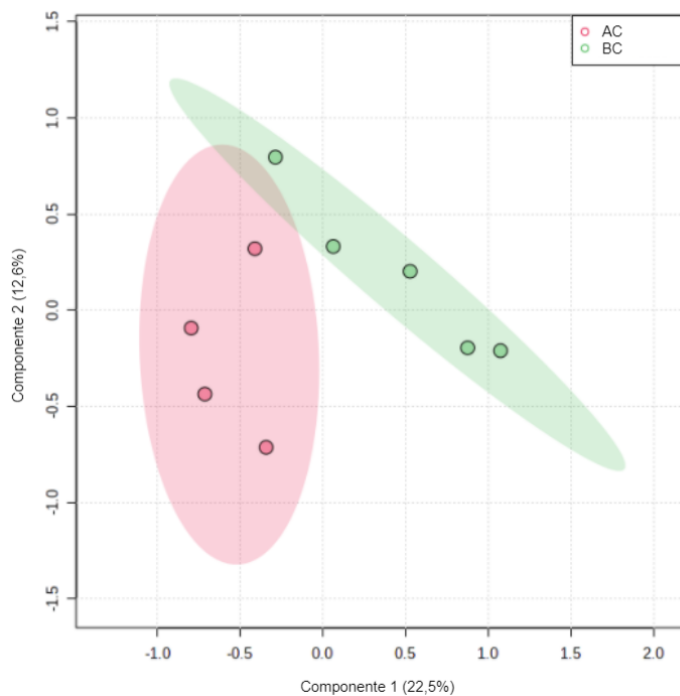
**Figura 4.** Abundância dos metabólitos mais e menos predominantes no plasma seminal de touros. **(A)** Os cinco metabólitos mais abundantes foram 1,3-Dioxan-5-ol, ácido octadecanoico, miristato de colessterila, ácido 2-etilheptanoico e isobutilamina. **(B)** Os metabólitos com menos abundância foram o ácido heptadecanoico, pirrolidina, ácido não-adeanoico, 1-etil-1-nitrosourea e o lactato de etila



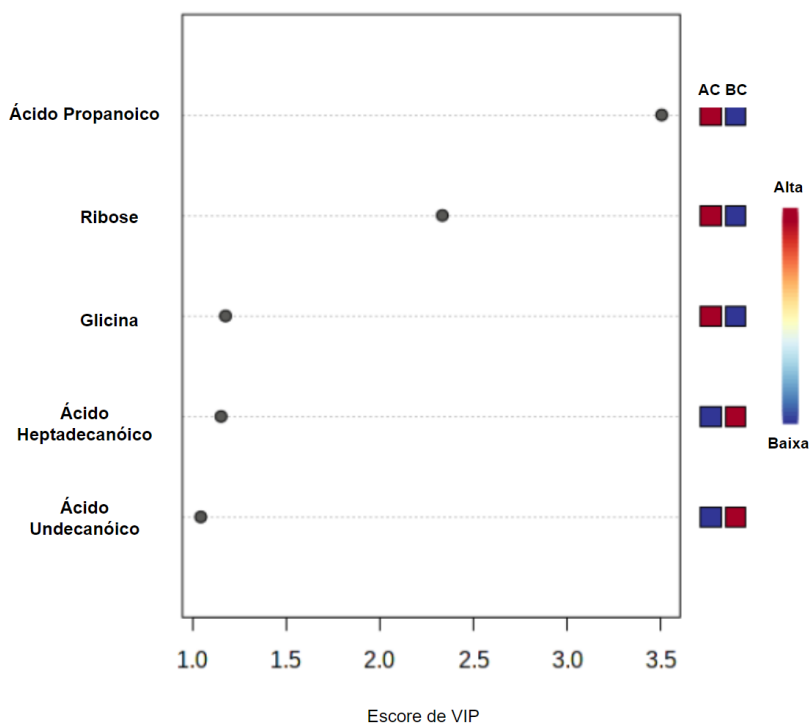
#### 4.4 Associações entre os metabólitos e a congelabilidade do plasma seminal dos touros

A análise estatística multivariada do metaboloma do plasma seminal dos touros, realizada através da PLS-DA, indicou uma separação distinta entre os touros de alta e baixa congelabilidade, de acordo com o gráfico das pontuações do PLS-DA (Figura 5). Os metabólitos com escore de VIP superior a 1,0 foram selecionados. Esses metabólitos incluem o ácido propanoico, ribose, glicina, ácido heptadecanoico e ácido undecanoico (Figura 6). A pontuação VIP foi baseada no modelo PLS-DA. Entre os compostos, o ácido propanoico obteve o VIP escore mais elevado (VIP = 3,5), seguido pela ribose (VIP = 2,3). As concentrações do ácido propanoico, da ribose e da glicina foram maiores nos touros de alta congelabilidade. Por outro lado, o ácido heptadecanoico e o ácido undecanoico foram mais predominantes em touros de baixa congelabilidade em comparação com os de alta (Figura 7). Houve, também, correlações significativas entre os metabólitos individuais (Figura 8), como a concentração de treonina foi positivamente correlacionada com o ácido butanoico (P-valor: 0,0042), heneicosano positivamente correlacionado com o pentadecano (P-valor: 0,0085) e a concentração de glicil-dl-alanina foi positivamente correlacionada com o heptadecano (P-valor: 0,0009). Além disso, a análise univariada (teste t) nos auxiliou a detectar um metabólito com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os touros de AC e BC (ribose).

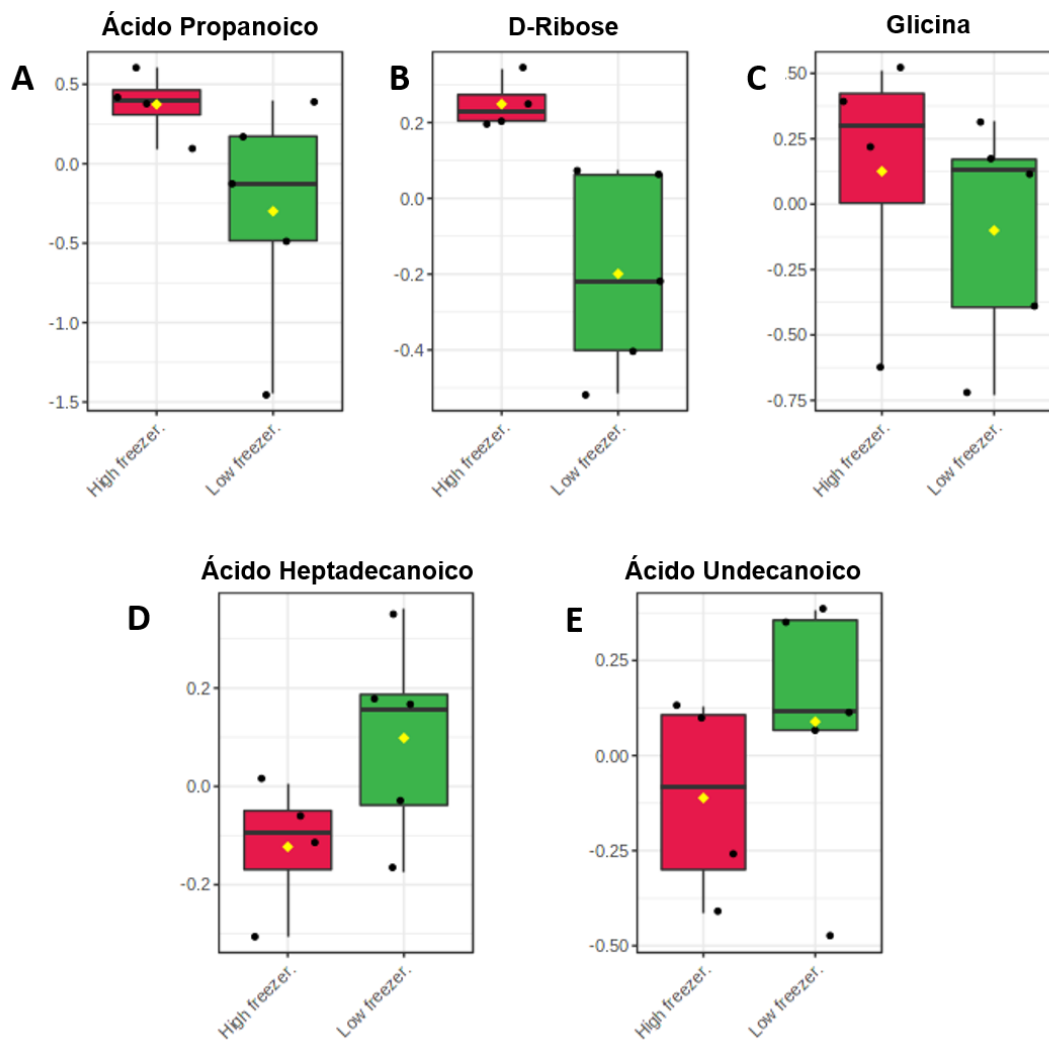
**Figura 5.** Pontuações de PLS-DA associadas aos metabólitos identificados através de GC-MS/MS no plasma seminal de touros de alta (AC) e baixa (BC) congelabilidade do sêmen.



**Figura 6.** Escores VIP relacionados aos metabólitos do plasma seminal de touros de alta (AC) e baixa congelabilidade (BC). O mapa de calor com os quadrados vermelhos e verdes indica a concentração alta ou baixa, respectivamente, do metabólito correspondente nos touros de AC e BC. A pontuação VIP foi baseada no modelo PLS-DA e considerou-se como determinantes para os fenótipos AC e BC os metabólitos com VIP > 1,0

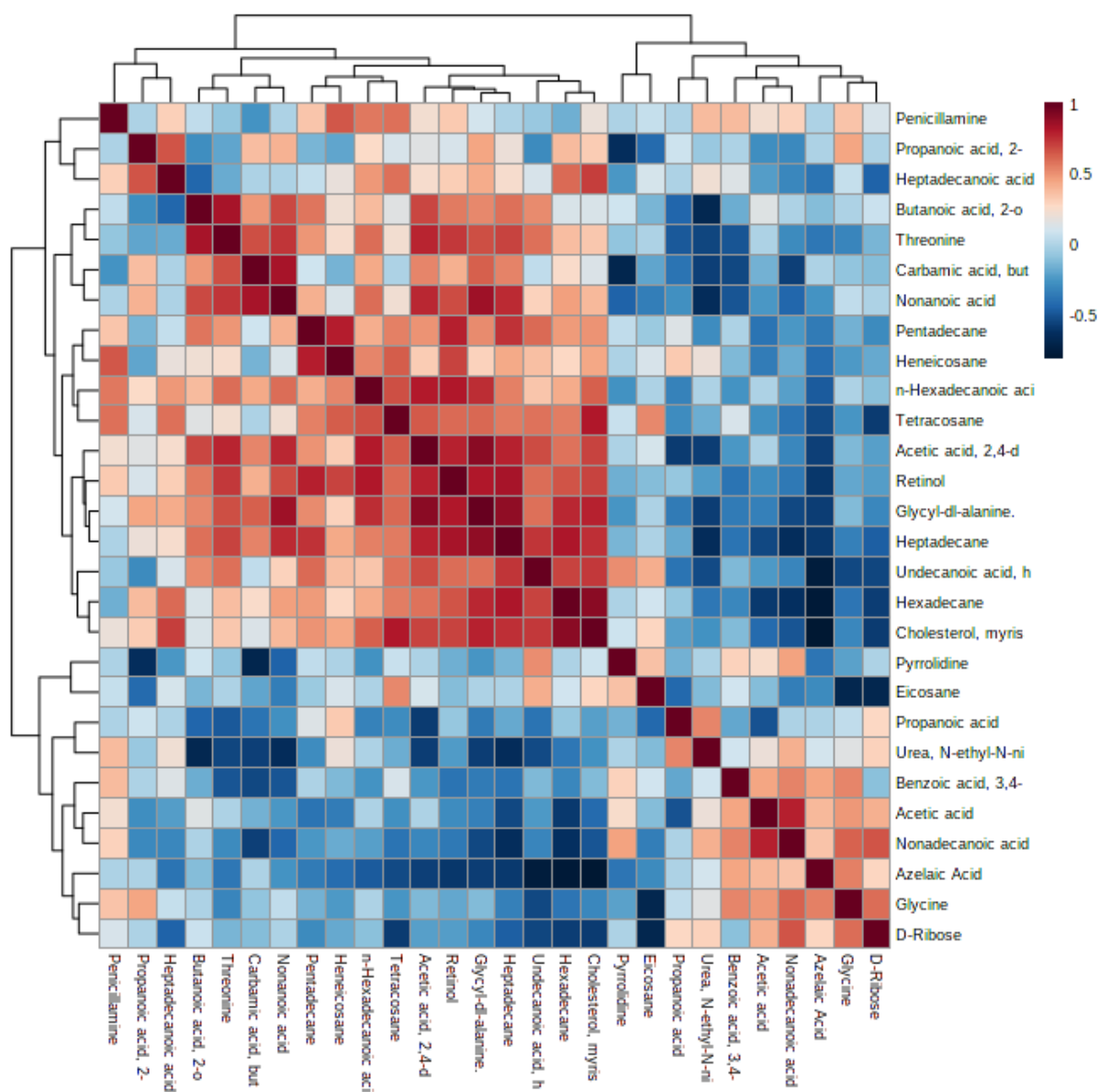


**Figura 7.** Box plot da abundância dos metabólitos identificados no plasma seminal de touros e que obtiveram VIP score > 1,0. Ácido propanoico (A), ribose (B), glicina (C), ácido heptadecanoico (D) e ácido undecanoico (E)



**Figura 8.** Correlações de Pearson entre os metabólitos identificados no plasma seminal de touros. (A) Mapa de calor das correlações de Pearson entre os metabólitos. (B) Matriz de correlação das concentrações dos metabólitos no plasma seminal (valor de P); caixas destacadas em amarelo representam  $P < 0,05$ .

**A**





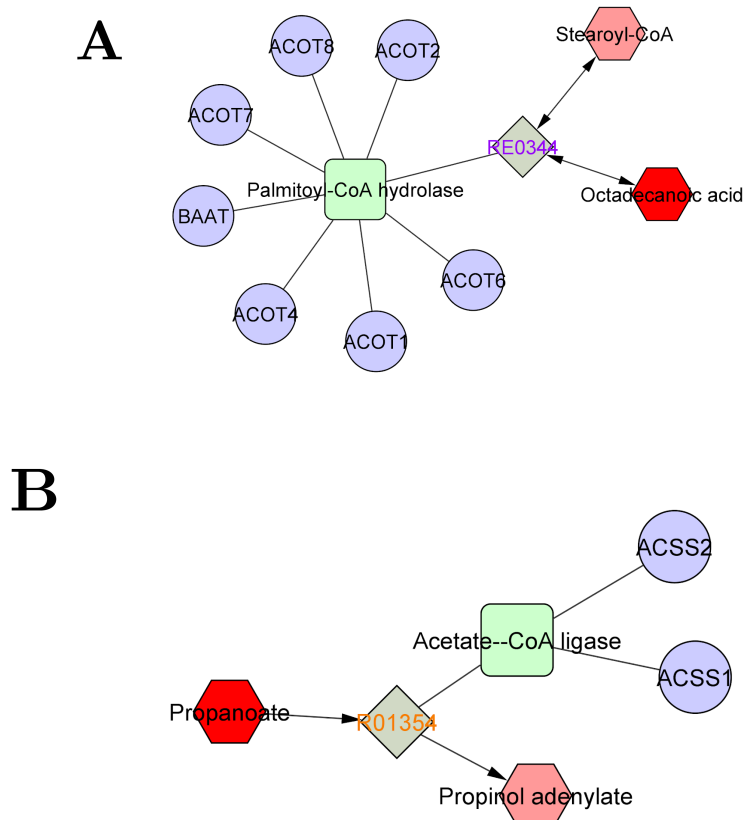
# B

	Penicill	Propan	Heptac	Butano	Threon	Carbar	Nonam	Pentad	Hexeic	n-Hexa	Tetracc	Acetic	Retinol	Glycyl-	Heptac	Undecr	Hexadi	Choles	Pyrrolit	Eicos	Propan	Urea	1-Benzoi	Acetic	Nonadi	Azelaic	Glycine	D-Ribo
Penicillamine	NA	0.9393	0.4122	0.8942	0.8590	0.5135	0.9153	0.3562	0.0538	0.1045	0.0902	0.5329	0.3792	0.7831	0.9067	0.8821	0.6866	0.6057	0.9638	0.8576	0.9662	0.3058	0.3079	0.5369	0.4248	0.9972	0.3488	0.7453
Propanoic acid, 2-	NA	0.0501	0.4675	0.6263	0.3173	0.2681	0.7294	0.6238	0.4800	0.7506	0.6812	0.7442	0.2209	0.5915	0.4518	0.3105	0.3827	0.0682	0.2666	0.8158	0.8821	0.9365	0.4696	0.4339	0.9841	0.2181	0.9639	
Heptadecanoic acid	NA	0.2472	0.6664	0.9973	0.9039	0.8778	0.6174	0.1778	0.0895	0.5082	0.3965	0.2411	0.5140	0.7556	0.0818	<b>0.0273</b>	0.5329	0.7631	0.9274	0.5658	0.7065	0.5735	0.4321	0.3083	0.8569	0.2309		
Butanoic acid, 2-o	NA	<b>0.0042</b>	0.1815	<b>0.0388</b>	0.0995	0.5624	0.3084	0.6838	<b>0.0357</b>	0.1106	0.1421	0.0889	0.1488	0.7379	0.7407	0.8096	0.7251	<b>0.0461</b>	0.6738	0.6940	0.9962	0.8034	0.9922	0.8385				
Threonine	NA	<b>0.0426</b>	<b>0.0208</b>	0.1733	0.5158	0.0861	0.5337	<b>0.0115</b>	<b>0.0233</b>	<b>0.0444</b>	<b>0.0319</b>	0.0924	0.3162	0.3696	0.8401	0.9777	0.1903	0.1310	0.1760	0.9214	0.4535	0.3640	0.4153	0.7272				
Carbamic acid, but	NA	<b>0.0046</b>	0.8033	0.7206	0.2378	0.9483	0.1341	0.2567	0.0633	0.1277	0.8956	0.4944	0.7198	<b>0.0383</b>	0.6215	0.3134	0.1138	0.1350	0.6999	0.1162	0.9253	0.8439	0.7792					
Nonanoic acid	NA	0.2561	0.7288	0.0866	0.5513	<b>0.0129</b>	<b>0.0398</b>	<b>0.0026</b>	<b>0.0142</b>	0.4208	0.2032	0.2991	0.2269	0.3727	0.4903	0.0628	0.1752	0.5367	0.2450	0.1125	0.8874	0.9113						
Pentadecane	NA	<b>0.0085</b>	0.2514	0.1245	0.1640	<b>0.0096</b>	0.1447	<b>0.0202</b>	0.0802	0.1840	0.1642	0.8831	0.8954	0.7084	0.4595	0.9066	0.3074	0.5326	0.3745	0.6952	0.4544							
Heptacosane	NA	0.1319	0.0602	0.3915	<b>0.0327</b>	0.4182	0.2373	0.3217	0.4521	0.2283	0.9280	0.7501	0.3805	0.5889	0.7626	0.3582	0.6620	0.2772	0.5455	0.6531								
n-Hexadecanoic acid	NA	<b>0.0431</b>	<b>0.0077</b>	<b>0.0063</b>	<b>0.0171</b>	0.1231	0.3594	0.2394	0.0634	0.5015	0.9512	0.3945	0.9158	0.5062	0.9156	0.5884	0.2056	0.9954	0.8071									
Tetracosane	NA	0.0580	0.0819	0.0751	0.1119	0.0928	0.1190	<b>0.0063</b>	0.8509	0.1384	0.4568	0.6702	0.7482	0.4845	0.3083	0.1279	0.5153	0.1031										
Acetic acid, 2,4-d	NA	<b>0.0113</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0109</b>	<b>0.0417</b>	0.0934	<b>0.0322</b>	0.9914	0.7669	0.1027	0.1059	0.5269	0.9345	0.4301	0.1153	0.7587	0.5833											
Retinol	NA	<b>0.0068</b>	<b>0.0043</b>	0.0858	0.0501	<b>0.0033</b>	0.8861	0.7878	0.8639	0.5589	0.3159	0.4648	0.3427	0.1058	0.6345	0.5736												
Glycyl-dl-alanine.	NA	<b>0.0009</b>	<b>0.0135</b>	<b>0.0103</b>	0.5152	0.9414	0.3498	0.1060	0.3559	0.3816	0.1342	0.1073	0.7731	0.4320														
Heptadecane	NA	<b>0.0219</b>	<b>0.0059</b>	<b>0.0186</b>	0.7285	0.9461	0.6424	0.0612	0.3137	0.1396	0.6467	0.1050	0.3826	0.2142														
Undecanoic acid, h	NA	<b>0.0322</b>	<b>0.0241</b>	0.1522	0.2535	0.3151	0.1428	0.7551	0.5426	0.4152	<b>0.0225</b>	0.1349	0.1329															
Hexadecane	NA	<b>0.0006</b>	0.9972	0.7920	0.8672	0.3319	0.4270	0.1004	0.7620	<b>0.0156</b>	0.3227	0.1100																
Cholesterol, myris	NA	0.8182	0.4401	0.5768	0.4935	0.7649	0.2683	0.1762	<b>0.0097</b>	0.4234	0.1025																	
Pyrrolidine	NA	0.3363	0.7035	0.9791	0.4181	0.5048	0.2137	0.3198	0.5942	0.9985																		
Eicosane	NA	0.2554	0.7659	0.7933	0.7903	0.3715	0.4271	<b>0.0431</b>	<b>0.0439</b>																			
Propanoic acid	NA	0.1355	0.6284	0.1663	0.9941	0.9243	0.8914	0.4504																				
Urea, N-ethyl-N-ni	NA	0.7856	0.5842	0.2644	0.7701	0.6821	0.4245																					
Benzoic acid, 3,4-	NA	0.2162	0.1268	0.2203	0.1338	0.8152																						
Acetic acid	NA	<b>0.0091</b>	0.2742	0.1819	0.2594																							
Nonadecanoic acid	NA	0.3314	0.0667	0.0517																								
Azelaic Acid	NA	0.1286	0.4605																									
Glycine	NA	0.0862																										
D-Ribose	NA																											

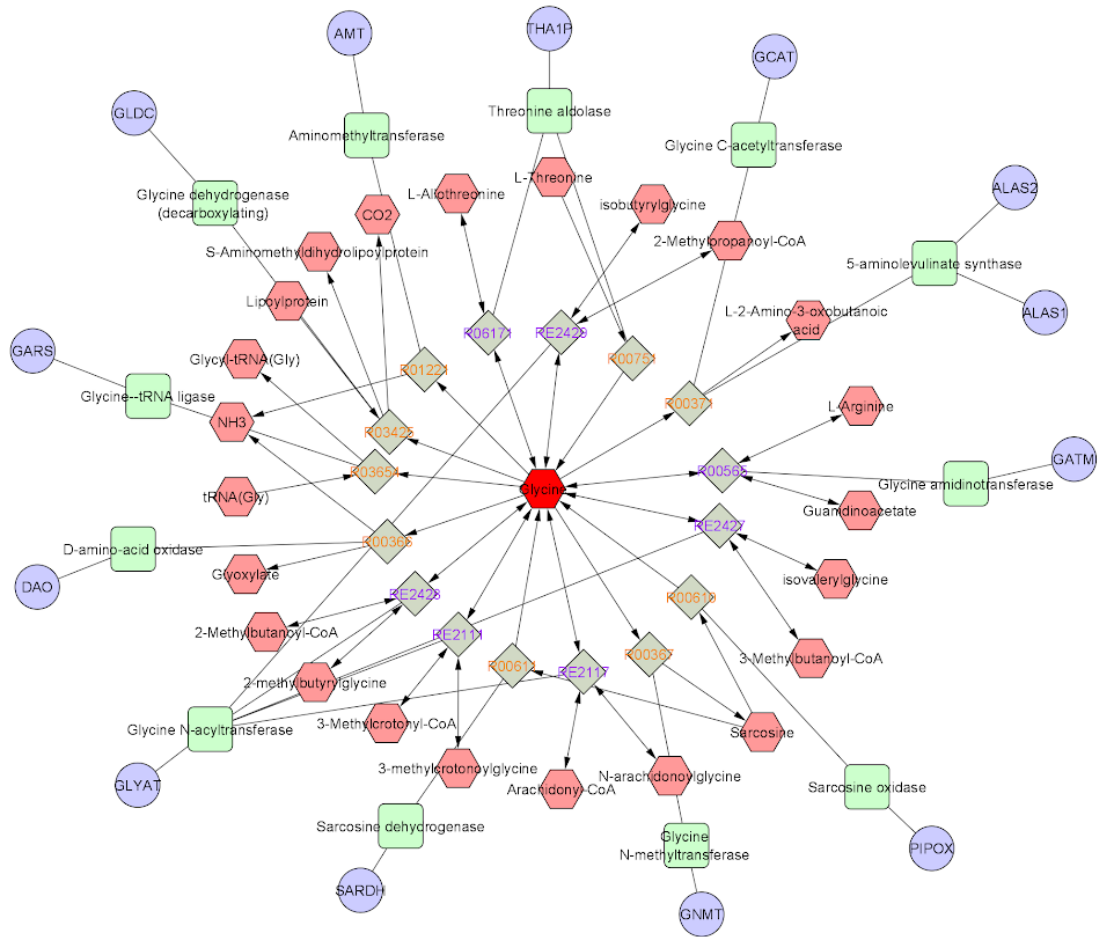
## 4.5 Redes metabólicas

As redes metabólicas foram determinadas para o ácido propanoico, ribose e glicina, os quais foram os metabólitos com maior escore de VIP, bem como para o ácido esteárico, que foi o metabólito mais abundante encontrado no plasma seminal dos touros. De acordo com as análises *in silico*, baseado na rede metabólica do ácido octadecanoico, ou ácido esteárico, (Figura 9A), a esteroil-CoA sofre uma reação reversível para produzir o ácido octadecanoico. Além disso, esse metabólito pode ser originado do ácido palmítico, que é precursor do mesmo. O ácido propanoico sofre uma reação irreversível para produzir adenilato de propanol (Figura 9B). A glicina pode sintetizar e ser sintetizada por várias reações reversíveis e não reversíveis, dando origem, por exemplo, à arginina, araquidonil-CoA, sarcosina, guanidinoacetato etc. (Figura 9C). A ribose sofre uma reação irreversível e sintetiza ribose-5-fosfato (Figura 9D).

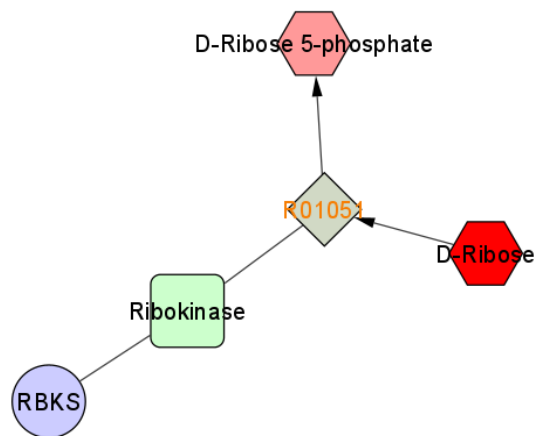
**Figura 9.** Vias metabólicas associadas às moléculas seminais mais abundantes (ácido esteárico) e com maiores pontuações VIP (Ácido propanoico, ribose e glicina), de acordo com a plataforma MetScape, com o plug-in Cytoscape. (A) ácido octadecanoico, (B) ácido propanoico, (C) glicina e (D) ribose. Os metabólitos são mostrados em hexágonos vermelhos. Quadrado cinza: Nó de reação com ID de reação; Hexágono vermelho claro: nó composto; Quadrado verde: nó da enzima; Círculo azul: nó do gene



C



D



## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi realizado análises empregando a técnica de cromatografia gasosa aliada com espectrômetro de massas (CG-EM) para analisar o perfil metabolômico do plasma seminal de touros da raça guzerá de alta e baixa congelabilidade espermática. Complementarmente, foi utilizado ferramentas bioinformáticas na identificação de interações e reações as quais os metabólitos encontrados fazem parte. É importante salientar que todos os touros apresentavam status reprodutivo normal para a utilização destes animais em monta a campo (Quirino et al., 2004; Torres-Junior; Henry, 2005). O estudo desses metabólitos, sejam carboidratos, peptídeos, ácidos graxos, esteroides, aminoácidos, entre outros, nos auxiliam a compreender melhor os processos biológicos relacionados à reprodução animal. Contudo, as contribuições dos metabólitos do plasma seminal para a criopreservação espermática ainda são um pouco desconhecidas. Como podemos ver em estudos anteriores (Jobim et al., 2004; Rêgo et al., 2016), apesar dos animais possuírem semelhantes características seminais no momento anterior à criopreservação, os mesmos reagem de forma diferente ao procedimento de congelabilidade.

Os metabólitos mais abundantes encontrados no plasma seminal dos touros foram 1,3-Dioxan-5-ol, ácido octadecanoico, miristato de colesterila, ácido 2-etilheptanoico e Isobutilamina; enquanto o ácido heptadecanoico, pirrolidina, ácido não-adecanoico, 1-etil-1-nitrosourea e o lactato de etila foram os metabólitos menos abundantes (Figura 4). O ácido octadecanoico, também conhecido como ácido esteárico ou 18:0, é um ácido graxo de cadeia longa, além de ser uma molécula muito hidrofóbica. O ácido palmítico (C16) é produzido na via de biossíntese dos ácidos graxos e é o precursor do ácido esteárico (C18). Essa reação ocorre fora da mitocôndria, no espaço intracelular (Figura 9A). O excesso de ácidos graxos no espermatozoide humano pode antecipar o estresse oxidativo que é observado na infertilidade masculina; porém, o ácido esteárico não produz espécies reativas do oxigênio (ERO) (Aitken et al., 2006). Alguns autores observaram que o nível de ácido esteárico foi significativamente maior em grupos de homens com astenozoospermia, astenoteratozoospermia, oligoastenoteratozoospermia e oligozoospermia do que em homens com normozoospermia (Zalata et al., 1998; Aksoy et al., 2006; Tavilani et al., 2006; Khosrowbeygi; Zarghami, 2007). Já em outro estudo o nível de ácido esteárico em homens inférteis diminuiu consideravelmente em relação ao grupo de homens saudáveis (Gulaya et al., 2001). Em amostras normozoospermicas, correlações positivas foram encontradas entre a

atividade de superóxido dismutase (SOD) e o ácido esteárico e de alguns ácidos graxos poli-insaturados (Calamera et al., 2003; Tavilani et al., 2008).

Em estudos realizados com javalis e hamsters, os autores observaram que os ácidos graxos saturados, ácidos esteáricos, assim como os ácidos palmítico, lignocérico, láurico e mirístico falharam em estimular a reação acrossômica do esperma nesses animais (Hossain et al., 2007; Meizel; Turner, 1983). Relativo à motilidade espermática, Martínez-Soto; Landeras; Gadea (2013) observaram que os parâmetros de motilidade pré e pós-congelamento estavam relacionados ao ácido esteárico e ao ácido docosahexaenoico. Foi também observado uma correlação negativa entre alguns ácidos graxos saturados, incluindo o ácido esteárico, na membrana espermática com os parâmetros seminais pós descongelamento (Martínez-Soto; Landeras; Gadea; 2013). A predominância do ácido esteárico entre os ácidos graxos saturados encontrados no plasma seminal, conforme relatado em pesquisas anteriores (Jain; Anand, 1976; Martínez-Soto, Landeras; Gadea, 2013; Diaz et al., 2013), são suportados por nosso estudo.

Outro ácido graxo encontrado no nosso estudo, foi o ácido propanoico. O ácido propanoico, também conhecido como ácido propiônico, é um ácido monocarboxílico acíclico comumente conhecido como ácido graxo de cadeia curta ou ácido graxo volátil. Nos ruminantes, os ácidos graxos saturados de cadeia curta são encontrados em altas concentrações no pré-estômago e são uma importante fonte de energia para esses animais (Bugaut, 1987). Além disso, a digestão de pectinas, fibras dietéticas encontradas na parede celular das plantas, dá origem principalmente ao ácido propanoico (Bezard; Bugaut, 1986). Depois de entrar na célula, este metabólito é convertido em adenilato de propanol via propionil-CoA sintetase e acetil-CoA sintetase. O adenilato de propanol é então convertido em propionil coenzima A através do mesmo par de enzimas. Propionil-CoA é um composto relativamente comum que pode surgir da quebra metabólica de ácidos graxos e de alguns aminoácidos (Figura 9B) (MacFabe et al., 2007). O glicerol e o propilenoglicol, *in vitro*, são fermentados e alterados em ácido propiônico. *In vivo*, o ácido propanoico é convertido em glicose, que serve de energia para o animal (Rémond; Souday; Jouany, 1993; Bergman, 1990; Francisco et al., 2002). Ademais, o ácido propanoico possui atividades antibacterianas e conservantes (Harrison, 1992). Logo, supõe-se que este ácido possa atuar como fonte de energia para os espermatozoides, e como componente antimicrobiano no plasma seminal, o que favorece a melhora nos parâmetros pós-descongelamento.

Considerando o valor do escore de VIP maior que 1, os metabólitos que se destacaram foram o ácido heptadecanoico, undecanoico, no grupo de baixa congelabilidade, e

o ácido propanoico, ribose e glicina no grupo de alta congelabilidade. A glicina é um aminoácido não essencial, simples e apolar, que está envolvida em diferentes vias biológicas e celulares e é um componente importante e precursora de muitas macromoléculas nas células, além de poder ser sintetizada por várias vias (Figura 9C). Os aminoácidos presentes no plasma seminal possuem variadas funções, desde redução de radicais livres à proteção das células contra a desnaturação (Mann; Lutwak-mann, 1981). Em estudos recentes, os autores observaram altos níveis de glicina, juntamente com alguns outros aminoácidos, no plasma seminal de frangos e touros (Santiago-Moreno et al., 2019; Ugur et al., 2020). Estudos indicam que nos espermatozoides da cauda do epidídimo caprino 150 mM de glicina apresentou significativo potencial crioprotetor em relação a perda total de motilidade espermática na ausência de aminoácidos; e 40 mM do mesmo aminoácido na presença de glicerol ou dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), apresentou uma das maiores recuperações de motilidade espermática pós-descongelamento (Kundu; Das; Majunder, 2001). Em contrapartida, em um estudo mais recente realizado com sêmen de búfalo (El-Sheshtawy; El-Sisy; El-Nattat, 2008), foi observado um aumento significativo na motilidade espermática e na integridade da membrana e do acrossoma pós-descongelamento, quando adicionado 25 mM de glicina ao diluente de congelamento padrão, porém, o aumento na concentração de glicina para 100 mM provocou redução significativa nos parâmetros observados acima em comparação com a concentração de 25 mM. Em outro estudo (Khalili et al., 2010), observou-se que a suplementação do diluidor (tris-citrato-frutose-gema de ovo) com 15 mM de glicina melhorou significativamente as características de congelamento-descongelamento de espermatozoides de carneiro, como motilidade, motilidade progressiva, viabilidade e integridade do acrossomo e da membrana. Alguns pesquisadores desenvolveram várias hipóteses para explicar esses mecanismos de proteção espermática realizada pelos aminoácidos durante a criopreservação, porém esse processo ainda é pouco compreendido. Postulamos, com base nos dados, que a glicina assim como alguns outros aminoácidos pode favorecer o processo de criopreservação dos espermatozoides por conta de atividades de oxidorreduções e por agir de maneira a proteger os mesmos de efeitos oxidantes e desnaturantes (Kundu; Das; Majunder, 2001; Flipse et al., 1956; 1958; Anchordoguy et al., 1988; Ugur et al., 2020).

No presente estudo, mostramos que a ribose foi um dos metabólitos que apresentou maior escore de VIP, sendo mais abundante em animais de alta congelabilidade do que em animais com congelabilidade baixa, e o único metabólito que teve diferença significativa ( $P = 0.014$ ). A d-ribose, também chamada de d-ribofuranose ou apenas de ribose,

é um açúcar encontrado em todas as células vivas e é vital para a vida. Por ser sintetizada em quase todos tecidos do corpo através de outras substâncias, este açúcar é um nutriente não essencial (Dhanoa; Housner., 2007). A ribose pode ser metabolizada na via pentose fosfato por ser originária da quebra de ácidos nucleicos que são catabolizados no processo digestivo. Além disso, a via da pentose fosfato está interligada à via da glicólise por meio do uso compartilhado de intermediários (Figura 9D). Foi observado em espermatozoides de homens que a uridina é catabolizada em ribose-1-fosfato e, conseqüentemente, é metabolizada como substrato de energia (Niemeyer et al., 2006). Em outro estudo, realizado com o esperma de homens férteis e inférteis, os autores observaram a presença de três homólogos de poli-ADP-ribose polimerase (PARP) no sêmen. A enzima PARP está envolvida no mecanismo de reparo do DNA e também pode ter um papel na remodelação da cromatina do esperma. No estudo, foi constatada uma correlação positiva entre a quantidade de proteína PARP e a maturidade espermática; além disso, os pesquisadores sugerem que a presença desses homólogos pode ter um papel na prevenção do estresse oxidativo, da apoptose e dos danos nos espermatozoides (Jha et al., 2009). A ribose é um componente da adenosina mono, di e trifosfato (AMP, ADP e ATP, respectivamente), do ácido desoxirribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA), por isso a presença desse açúcar em uma forma livre é interessante. Essa forma livre pode ser derivada das degradações de nucleotídeos, nucleosídeos ou até mesmo do ácido nucléico, pelas enzimas nucleolíticas contidas no sêmen e órgãos acessórios humanos (Mann; Rottemberg, 1966; Dhanoa; Housner, 2007). Outras pesquisas também observaram a presença de ribose no plasma seminal humano (Størset; Stokke; Jellum, 1978; Anderson Jr. et al., 1979; Mann; Rottember, 1966; Guo et al., 2017). Subentende-se que a ribose pode influenciar na prevenção da apoptose celular, na redução de estresse oxidativo e na reparação de danos ao DNA, além de servir como fonte de energia para o organismo.

Ademais, os resultados do PLS-DA demonstram uma separação distinta entre os grupos de alta e baixa congelabilidade. Essas descobertas são importantes, pois nos levam a uma melhor compreensão de como os metabólitos atuam e como podem afetar a congelabilidade espermática e, conseqüentemente, nos auxiliam tanto a aprimorar como a desenvolver novos diluidores seminais, além de descobrir potenciais biomarcadores. Porém, ainda mais trabalhos precisam ser desenvolvidos para a melhor compreensão da ribose no plasma seminal em relação a fertilidade e congelabilidade espermática.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos que 1,3-Dioxan-5-ol, ácido octadecanoico, miristato de coleserila, ácido 2-etilheptanóico e isobutilamina são os metabólitos predominantes no plasma seminal de touros de ambos os grupos. Porém, comprovou-se uma clara distinção dos perfis metabólitos entre touros de alta e baixa congelabilidade de acordo com o gráfico das pontuações do PLS-DA. Segundo nossos achados, os perfis de metabólitos do plasma seminal podem ser usados para determinar os fenótipos de congelabilidade; além disso, a ribose pode ser considerada um biomarcador de congelabilidade seminal em touros. Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a conduzir uma avaliação dos metabólitos no plasma seminal de touros da raça Guzará relacionados com diferentes fenótipos de congelabilidade. As descobertas desta pesquisa servirão de auxílio para o desenvolvimento da nossa compreensão sobre os mecanismos de criopreservação espermática.



## REFERÊNCIAS

- ADIPIETRO, K.A.; MAINLAND, J.D.; MATSUNAMI, H. Functional evolution of mammalian odorant receptors. **PLoS Genet**, v. 8, n. 7, p. e1002821, 2012.
- AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W. & VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 5, p. 2017-2025, 1995.
- AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; DE IULIIS, G.N.; KOPPERS, A.J. & MCLAUGHLIN. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4154-4163, 2006.
- AKSOY, Y.; AKSOY, H.; ALTINKAYNAK, K.; AYDIN, H.R.; & ÖZKAN, A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 2, p. 75-79, 2006.
- ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N.; TROEDSSON, M.H.T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 593-600, 2004.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of equine veterinary science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- ANCHORDOGUY, T.; CARPENTER, J.F.; LOOMIS, S.H.; & CROWE, J.H. Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipid bilayers during freezing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 946, n. 2, p. 299-306, 1988.
- ANDERSON Jr, R.A.; REDDY, J.M.; OSWALD, C.; & ZANEVELD, L.J. Enzymic determination of fructose in seminal plasma by initial rate analysis. **Clinical chemistry**, v. 25, n. 10, p. 1780-1782, 1979.
- AWAD, M.M. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 3-4, p. 157-162, 2011.
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.
- BERTOLDO, M.; NADAL-DESBARATS, L.; GÉRARD, 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. 221-231, 2013.
- BEZARD, J.; BUGAUT, M. Absorption of glycerides containing short, medium, and long chain fatty acids. In: **Fat absorption**. CRC Press, 2018. p. 119-158.

BIENIEK, J.M.; DRABOVICH, A.P.; LO, K.C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 3, p. 426, 2016.

BUGAUT, M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 86, n. 3, p. 439-472, 1987.

CALAMERA, J.; BUFFONE, M.; OLLERO, M.; ALVAREZ, J.; & DONCEL, G.F. Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 66, n. 4, p. 422-430, 2003.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2a. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1998.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A.R. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 26, n. 11, p. 937-940, 1999.

CHEN, R.; MIAS, G.I.; LI-POOK-THAN, J.; JIANG, L.; LAM, H.Y.; CHEN, R.; ... & SNYDER, M. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1293-1307, 2012.

COSTELLO, L.C.; FRANKLIN, R.B. Concepts of citrate production and secretion by prostate 1. Metabolic relationships. **The Prostate**, v. 18, n. 1, p. 25-46, 1991.

Darr, C.R.; Varner, D.D.; Teague, S.; Cortopassi, G.A.; Datta, S.; & Meyers, S.A. Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 2, p. 34, 1-11, 2016.

DE LAMIRANDE, E. V. E.; HARAKAT, AZIZ; GAGNON, CLAUDE. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. **Journal of andrology**, v. 19, n. 2, p. 215-225, 1998.

DE LAS HERAS, M.A.; VALCARCEL, A.; PEREZ, L.J. In vitro capacitating effect of gamma-aminobutyric acid in ram spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 4, p. 964-968, 1997.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, 1992.

DHANOVA, Teginder S.; HOUSNER, Jeffrey A. Ribose: more than a simple sugar?. **Current sports medicine reports**, v. 6, n. 4, p. 254-257, 2007.

Diaz, R.; Inostroza, K.; Risopatron, J.; Sanchez, R.; & Sepulveda, N. Identification of fatty acids in canine seminal plasma. **Andrologia**, v. 46, n. 2, p. 194-197, 2014.

DU PLESSIS, S.S.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G.; & VAN DER LINDE, M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 2, p. 230, 2015.

DUNBAR, B.S.; AVERY, S.; LEE, V.; PRASAD, S.; SCHWAHN, D.; SCHWOEBEL, E.; ... & WILKINS, B. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. **Reproduction, fertility and development**, v. 6, n. 3, p. 331-347, 1994.

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. **Chemical society reviews**, v. 40, n. 1, p. 387-426, 2011.

EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-SISY, G.A.; EL-NATTAT, W.S. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. **Global Veterinaria**, v. 2, n. 4, p. 146-150, 2008.

FELIPE-SILVA, A.S., VALE FILHO, V.R., FERREIRA, M.B.D., CORREA, G.S.S., SILVA, M.A., VERAS, M.M., & ANDRADE, V.J. Effects of the extender in the semen post-thaw viability in young dairy Gyr bulls (*Bos taurus indicus*), pre-selected by breeding soundness evaluation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 81-86, 2011.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and functional genomics**, v. 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. **Functional genomics**, p. 155-171, 2002.

FLEGEL, C.; VOGEL, F.; HOFREUTER, A.; SCHREINER, B.S.; OSTHOLD, S.; VEITINGER, S.; ... & GISSELMANN, G. Characterization of the olfactory receptors expressed in human spermatozoa. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 2, p. 73, 2016.

FLIPSE, R.J. Metabolism of glycine by bovine spermatozoa. **Science**, 124(3214), 228-228, 1956.

FLIPSE, R.J.; ALMQUIST, J.O. Diluters for Bovine Semen. IX. Motility of Bovine Spermatozoa in Milk-Glycine and Egg Yolk-Glycine Diluents with and Without Glycerol. **Journal of Dairy Science**, v. 39, n. 12, p. 1690-1696, 1956.

FLIPSE, R.J.; ALMQUIST, J.O. Metabolism of bovine semen. IV. Effects of glycine and glycerol on the glycolytic and respiratory activity of bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 12, p. 1787-1791, 1958.

FRANCISCO, C.C.; CHAMBERLAIN, C.S.; WALDNER, D.N.; WETTEMANN, R.P.; & SPICER, L.J. Propionibacteria fed to dairy cows: effects on energy balance, plasma metabolites and hormones, and reproduction. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 7, p. 1738-1751, 2002.

FURMAN, J.W.; BALL, L.; SEIDEL JR, G.E. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. **Journal of animal science**, v. 40, n. 4, p. 665-670, 1975.

GARCÍA, B.M; FERNÁNDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; RODRÍGUEZ, A.M., MARTINEZ, H.R., ... & PENA, F.J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 1, p. 141-148, 2011.

GARCIA, M. A.; GRAHAM, E. F. Factors affecting the removal of low-molecular-weight fractions (LMWF) from egg yolk and seminal plasma in extended semen by dialysis: effect on post-thaw sperm survival. **Cryobiology**, v. 24, n. 5, p. 437-445, 1987.

GILANY, K.; MOAZENI-POURASIL, R.S.; JAFARZADEH, N.; & SAVADI-SHIRAZ, E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 1, p. 84-86, 2014.

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. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 3, p. 75, 1-15, 2012.

GROGAN, D.E.; MAYER, D.T.; SIKES, J.D. Quantitative differences in phospholipids of ejaculated spermatozoa and spermatozoa from three levels of the epididymis of the boar. **Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 431-436, 1966.

GULAYA, N.M.; MARGITICH, V.M.; GOVSEEVA, N.M.; KLIMASHEVSKY, V.M.; GORPYNCHENKO, I.I.; & BOYKO, M.. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archives of andrology**, v. 46, n. 3, p. 169-175, 2001.

GUO, D.; WU, W.; TANG, Q.; QIAO, S.; CHEN, Y.; CHEN, M.; ... & WANG, X. The impact of BMI on sperm parameters and the metabolite changes of seminal plasma concomitantly. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 48619, 2017.

Hafez, E.S.E., Hafez, B. Ciclos Reprodutivos: Bovinos e bubalinos. 7a ed., São Paulo, **Manole**, p.158-171, 2004.

HARRISON, P.T.C. Propionic acid and the phenomenon of rodent forestomach tumorigenesis: a review. **Food and chemical toxicology**, v. 30, n. 4, p. 333-340, 1992.

HENRY, M.; ECHEVERRI, A.M.L. Andrologia veterinária básica. **Belo Horizonte: CAED-UFMG**, 2013.

HOLLYWOOD, K.; BRISON, D.R.; GOODACRE, R. Metabolomics: current technologies and future trends. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4716-4723, 2006.

HOSSAIN, S.; TAREQ, K.M.A.; HAMMANO, K.I.; & TSUJII, H. Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. **Reproductive medicine and biology**, v. 6, n. 4, p. 235-239, 2007.

HU, S.G.; LIANG, A.J.; YAO, G.X.; LI, X.Q.; ZOU, M.; LIU, J.W.; & SUN, Y. The dynamic metabolomic changes throughout mouse epididymal lumen fluid potentially contribute to sperm maturation. **Andrology**, v. 6, n. 1, p. 247-255, 2018.

HUMPHREY, G. F.; MANN, T. Studies on the metabolism of semen. 5. Citric acid in semen. **Biochemical Journal**, v. 44, n. 1, p. 97, 1949.

JHA, R.; AGARWAL, A.; MAHFOUZ, R.; PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; SABANEH, E.; ... & SHARMA, R. Determination of Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) homologues in human ejaculated sperm and its correlation with sperm maturation. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 3, p. 782-790, 2009.

JAIN, Y.C.; ANAND, S.R. Fatty acids and fatty aldehydes of buffalo seminal plasma and sperm lipid. **Reproduction**, v. 47, n. 2, p. 261-267, 1976.

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. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 31, n. 9, p. 1195-1204, 2014.

JIN, J.Y.; CHEN, W.Y.; ZHOU, C.X.; CHEN, Z.H.; YU-YING, Y.; NI, Y.; ... & SHI, Q.X. Activation of GABAA receptor/Cl<sup>-</sup> channel and capacitation in rat spermatozoa: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> are essential. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 55, n. 2-3, p. 97-108, 2009.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; & MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 255-266, 2004.

JUYENA, N.S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012.

KAMP, G.; LAUTERWEIN, J. Multinuclear magnetic resonance studies of boar seminal plasma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1243, n. 1, p. 101-109, 1995.

KARNOVSKY, A.; WEYMOUTH, T.; HULL, T.; TARCEA, V.G.; SCARDONI, G.; LAUDANNA, C.; ... & OMENN, G.S. Metscape 2 bioinformatics tool for the analysis and visualization of metabolomics and gene expression data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 3, p. 373-380, 2012.

KHALILI, B.; JAFAROGHLI, M.; FARSHAD, A.; & PARESH-KHIAVI, M. The effects of different concentrations of glycine and cysteine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 3, p. 318-325, 2010.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N.. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 2, p. 117-121, 2007.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

Kumar, A.; Kroetsch, T.; Blondin, P.; & Anzar, M. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance analysis. **Molecular reproduction and development**, v. 82, n. 2, p. 123-131, 2015.

KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, v. 42, n. 1, p. 21-27, 2001.

LIBERDA, J.; KRAUS, M.; RYSLAVA, H.; VLASAKOVA, M.; JONAKOVA, V.; & TICHÁ, M. D-fructose-binding proteins in bull seminal plasma: isolation and characterization. **FOLIA BIOLOGICA-PRAHA-**, v. 47, n. 4, p. 113-119, 2001.

LONG, J.A. The 'omics' revolution: Use of genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic tools to predict male reproductive traits that impact fertility in livestock and poultry. **Animal Reproduction Science**, p. 106354, 2020.

LUNDIN, M.; BALTSCHIEFFSKY, H.; RONNE, H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 19, p. 12168-12172, 1991.

MACFABE, D.F.; CAIN, D.P.; RODRIGUEZ-CAPOTE, K.; FRANKLIN, A E.; HOFFMAN, J.E.; BOON, F.; ... & OSSENKOPP, K.P. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. **Behavioural brain research**, v. 176, n. 1, p. 149-169, 2007.

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. **Biochemical Journal**, v. 40, n. 4, p. 481, 1946.

MANN, T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.**, 1964.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems. In: **Male reproductive function and semen**. Springer, London, 1981. p. 269-336.

MANN, T.; ROTTENBERG, D.A. The carbohydrate of human semen. **Journal of Endocrinology**, v. 34, n. 2, p. 257-NP, 1966.

MANN, T.; WHITE, I.G. Glycerol metabolism by spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 65, n. 4, p. 634, 1957.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W.N.P.; BOROS, L.G.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; ... & CASCANTE, M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS letters**, v. 554, n. 3, p. 342-346, 2003.

- MARTÍNEZ-SOTO, J.C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 365-375, 2013.
- 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. **Journal of reproduction and development**, v. 52, n. 6, p. 805-810, 2006.
- MAXWELL, W.M.C.; DE GRAAF, S.P.; GHAOUI, R.E.H.; & EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 13, 2007.
- MEIZEL, S.; & TURNER, K.O. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. **FEBS letters**, v. 161, n. 2, p. 315-318, 1983.
- MENEZES, E.B.; Velho, A.L.C.; Santos, F.; Dinh, T.; Kaya, A.; Topper, E.; ... & Memili, E. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2019.
- MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; & KILLIAN, G.J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of andrology**, v. 27, n. 4, p. 534-541, 2006.
- 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. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 74, n. 2, p. 214-222, 2007.
- NAGASE, H. Deep-freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. In: **Proceedings of the 4th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. p. 410-415, 1964.
- NICHOLSON, J.K.; LINDON, J.C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181-1189, 1999.
- NIEMEYER, T.; DIETZ, C.; FAIRBANKS, L.; SCHROEDER-PRINTZEN, I.; HENKEL, R.; & LÖEFFLER, M. Evaluation of uridine metabolism in human and animal spermatozoa. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 25, n. 9-11, p. 1215-1219, 2006.
- NIJS, M.; CREEMERS, E.; COX, A.; JANSSEN, M.; VANHEUSDEN, E.; CASTRO-SANCHEZ, Y.; ... & OMBELET, W. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. **Reproductive biomedicine online**, v. 19, n. 2, p. 202-206, 2009.
- O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human reproduction**, v. 17, n. 3, p. 704-709, 2002.

O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. Lactate dehydrogenase-C4 is involved in heparin- and NADH-dependent bovine sperm capacitation. **Andrologia**, v. 34, n. 2, p. 91-97, 2002.

ODET, F.; GABEL, S.A.; WILLIAMS, J.; LONDON, R. E.; GOLDBERG, E.; & EDDY, E.M. Lactate dehydrogenase C and energy metabolism in mouse sperm. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 3, p. 556-564, 2011.

OLIVER, S.G.; WINSON, M.K.; KELL, D.B.; & BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

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

PATRAT, C.; SERRES, C.; JOUANNET, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the Cell**, v. 92, n. 3-4, p. 255-266, 2000.

PATTI, G.J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 263-269, 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. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 462, n. 3, p. 257-262, 2015.

PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; FERRAMOSCA, A.; & ZARA, V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **International journal of andrology**, v. 35, n. 2, p. 109-124, 2012.

PUENTE, M.A.; TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Bull sperm acrosome reaction induced by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABAergic receptors type A. **Animal reproduction science**, v. 127, n. 1-2, p. 31-37, 2011.

QIU, J.H.; LI, Y.W.; XIE, H.L.; LI, Q.; DONG, H.B.; SUN, M.J.; ... & TAN, J.H. Effects of glucose metabolism pathways on sperm motility and oxidative status during long-term liquid storage of goat semen. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 839-849, 2016.

QUIRINO, C.R.; BERGMANN, J.A.G.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; REIS, S.R.; MENDONÇA, R.M.; & FONSECA, C.G. Genetic parameters of libido in Brazilian Nelore bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 1-7, 2004.

RECUERO, S.; FERNANDEZ-FUERTES, B.; BONET, S.; BARRANCO, I.; & YESTE, M. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 137, p. 36-42, 2019.



RÊGO, J.P.A. Análise proteômica do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês adultos. Universidade Federal do Ceará. **Pós-Graduação em Zootecnia (Dissertação de Mestrado)**, p. 109, 2010.

RÊGO, J.P.A.; MARTINS, J.M.; WOLF, C.A.; VAN TILBURG, M.; MORENO, F.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; ... & MOURA, A.A. Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzarat bulls. **Journal of animal science**, v. 94, n. 12, p. 5308-5320, 2016.

RÉMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J.P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 121-132, 1993.

RITTA, M.N.; BAS, D.E.; TARTAGLIONE, C.M. In vitro effect of gamma-aminobutyric acid on bovine spermatozoa capacitation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 67, n. 4, p. 478-486, 2004.

ROBERTS, E., & FRANKEL, S.  $\gamma$ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 187, p. 55-63, 1950

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. **Animal reproduction science**, v. 161, p. 82-88, 2015.

SANTIAGO-MORENO, J.; BERNAL, B.; PÉREZ-CEREZALES, S.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; ESTESO, M. C.; ... & BLESBOIS, E. Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: role of seminal plasma on sperm cryoresistance. **PLoS one**, v. 14, n. 1, p. e0209910, 2019.

SCOTT, T.W.; VOGLMAYR, J.K.; SETCHELL, B.P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 102, n. 2, p. 456, 1967.

SIEGHART, W. GABAA receptors: ligand-gated Cl<sup>-</sup> ion channels modulated by multiple drug-binding sites. **Trends in pharmacological sciences**, v. 13, p. 446-450, 1992.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.

SOUSA, S. D.; LUCINI, L.; AJMONE-MARSAN, P.; VAN TILBURG, M.F.; & MOURA, A.A. Untargeted metabolomic profiling of accessory sex gland fluid from Morada Nova rams. **Molecular reproduction and development**, v. 87, n. 4, p. 409-418, 2020.

SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.; MONACO, E.; & KILLIAN, G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 72-89, 2008.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, S.K.; GHOSH, S.K.; SINGH, L.P.; PRASAD, J.K.; KUMAR, A.; ... & THAMIZHARASAN, A. Sequestration of PDC-109 protein improves

freezability of crossbred bull spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 131, n. 1-2, p. 54-62, 2012.

STØRSET, P.; STOKKE, O.; JELLUM, E. Monosaccharides and monosaccharide derivatives in human seminal plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 145, n. 3, p. 351-357, 1978.

TANG, B.; SHANG, X.; QI, H.; LI, J.; MA, B.; AN, G.; & ZHANG, Q. Metabonomic analysis of fatty acids in seminal plasma between healthy and asthenozoospermic men based on gas chromatography mass spectrometry. **Andrologia**, v. 49, n. 9, p. e12744, 2017.

TANG, H.; DUAN, C.; BLEHER, R.; & GOLDBERG, E. Human lactate dehydrogenase A (LDHA) rescues mouse Ldhc-null sperm function. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 4, p. 96, 1-6, 2013.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; ABDI, K.; VAISIRAYGANI, A.; & JOSHAGHANI, H.R. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. **Andrologia**, v. 38, n. 5, p. 173-178, 2006.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; NOURMOHAMMADI, I.; MAHJUB, H.; VAISIRAYGANI, A.; SALIMI, S.; & HOSSEINIPANAH, S.M. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 1, p. 45-50, 2007.

TAVILANI, H.; GOODARZI, M.T.; DOOSTI, M.; VAISI-RAYGANI, A.; HASSANZADEH, T.; SALIMI, S.; & JOSHAGHANI, H.R. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. **Reproductive biomedicine online**, v. 16, n. 5, p. 649-656, 2008.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; HENRY, M. Sexual development of Guzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. **Animal Reproduction (AR)**, v. 2, n. 2, p. 114-121, 2018.

Traldi, A.S. Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos. **São Paulo**, 1994.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; ... & BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 171-186, 2005.

TULSIANI, D.R.P; YOSHIDA-KOMIYA, H.; ARAKI, Y.. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 3, p. 487-494, 1997.

TUMMARUK, P.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S.; & DALIN, A.M. Reproductive performance of purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire sows: I. Seasonal variation and parity influence. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 205-216, 2000.

UGUR, M.R.; DINH, T.; HITIT, M.; KAYA, A.; TOPPER, E.; DIDION, B.; & MEMILI, E. Amino acids of seminal plasma associated with freezability of bull sperm. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 347, 2020.

- Velho, A.L.C.; Menezes, E.; Dinh, T.; Kaya, A.; Topper, E.; Moura, A.A.; & Memili, E. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e0195279, 2018.
- VISCONTI, P.E. Sperm bioenergetics in a nutshell. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 3, p. 72, 1-4, 2012.
- VOGLMAYR, J.K.; SCOTT, T.W.; SETCHELL, B.P.; & WAITES, M. Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of testicular fluid collected from conscious rams. **Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 87-99, 1967.
- WALLACH, E.; AMELAR, R.D.; DUBIN, L.; & SCHOENFELD, C.Y. Sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 34, n. 3, p. 197-215, 1980.
- WHITE, I.G.; GOH, P.; VOGLMAYR, J.K. Effect of male reproductive tract fluids and proteins on the metabolism and motility of ram spermatozoa. **Archives of andrology**, v. 19, n. 2, p. 115-125, 1987.
- XIA, J.; SINELNIKOV, I.V.; HAN, B.; & WISHART, D.S. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W251-W257, 2015.
- XIA, J.; WISHART, D.S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature protocols**, v. 6, n. 6, p. 743-760, 2011.
- YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.
- 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.
- ZALATA, A.A.; CHRISTOPHE, A.B.; DEPUYDT, C.E.; SCHOONJANS, F.; & COMHAIRE, F.H. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Molecular human reproduction**, v. 4, n. 2, p. 111-118, 1998.
- ZHANG, J.; HUANG, Z.; CHEN, M.; XIA, Y.; MARTIN, F.L.; HANG, W.; & SHEN, H. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 1, p. 44-53. e12, 2014.
- ZHANG, X.; DIAO, R.; ZHU, X.; LI, Z.; & CAI, Z. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. **Clinica Chimica Acta**, v. 450, p. 254-261, 2015.
- ZHU, Z.; LI, R.; MA, G.; BAI, W.; FAN, X.; LV, Y.; ... & ZENG, W. 5'-AMP-Activated protein kinase regulates goat sperm functions via energy metabolism in vitro. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 2420-2431, 2018.