



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**METABOLÔMICA DAS FEZES DE TOUROS NELORE SUBMETIDOS À
SELEÇÃO**

KARINA GISSELLE IBARRA CARDOZO

Foz do Iguaçu
2021

**METABOLÔMICA DAS FEZES DE TOUROS NELORE SUBMETIDOS À
SELEÇÃO**

KARINA GISSELLE IBARRA CARDOZO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

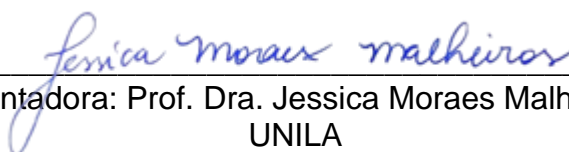
Orientadora: Prof. Dra. Jessica Moraes Malheiros.

KARINA GISSELLE IBARRA CARDOZO

**METABOLÔMICA DAS FEZES DE TOUROS NELORE SUBMETIDOS À
SELEÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Latino-Americano de
Ciências da Vida e da Natureza da
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof. Dra. Jessica Moraes Malheiros.
UNILA



Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA



Prof. MSc. Mateus Henrique Vargas de Oliveira
(UNESP)

Foz do Iguaçu, 05 de novembro de 2021.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Karina Gisselle Ibarra Cardozo

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: METABOLÔMICA DAS FEZES DE TOUROS NELORE SUBMETIDOS À SELEÇÃO.

Nome do orientador(a): Prof. Dra. Jessica Moraes Malheiros.

Data da Defesa: 08/10/2021

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

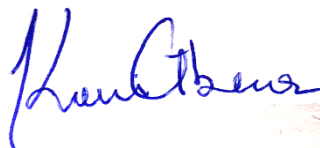
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 05 de novembro de 2021.



"Este trabajo está dedicado a las personas que han estado a mi lado a lo largo de toda la vida: mis padres Teofilo y Graciela, que no han medido esfuerzos para mi formación. ¡Deseo haber sido merecedora de todo su apoyo y amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por colocar pessoas maravilhosas em minha vida e por ter me dado forças e sabedoria nessa jornada.

À minha família por todo o suporte, incentivo, compreensão e por se orgulharem tanto de mim. Mãe, pai, Fiorella e Fanny: Sem vocês, nada disso seria possível. Amo vocês!

Aos meus amigos do curso de graduação pelo apoio emocional nessa trajetória, especialmente a minha colega Victoria pelas risadas e noites de estudo.

À Prof. Dra. Jessica Moraes Malheiros, por aceitar ser minha orientadora de TCC, pela paciência e pela disposição, e por contribuir não somente para meu crescimento profissional como também o pessoal. Sem o seu apoio, isto não teria sido possível.

Ao Programa de Melhoramento Nelore Qualitas pela concessão do banco de dados. Ao Centro de Inovação em Genética e Nutrição Animal (CIGNA - UNESP, Botucatu - SP) coordenado pelo Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva pelas amostras de fezes utilizadas no presente estudo.

À Universidade Federal de Integração Latino-americana, por me dar a oportunidade de realizar este curso e por me proporcionar conhecer pessoas com culturas e experiências maravilhosas.

E a todos os que participaram direta ou indiretamente da minha formação e da conclusão desse projeto, deixo aqui minha gratidão.

"A inteligência é o farol que nos guia, mas é a vontade que nos faz caminhar..."

Érico Veríssimo

"Continue a nadar, continue a nadar..."

Dory

IBARRA CARDOZO, Karina Gisselle. **METABOLÔMICA DAS FEZES DE TOUROS NELORE SUBMETIDOS À SELEÇÃO**. 48 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMO

O objetivo do estudo foi investigar as diferenças nos perfis metabólicos das fezes de touros selecionados por meio do índice de seleção. Cento e oito touros da raça Nelore foram confinados com a mesma dieta durante 77 dias. O perímetro escrotal de cada animal foi obtido, o sêmen foi coletado e submetido ao espermograma. As amostras de fezes foram coletadas para os ensaios de metabolômica. O índice de seleção foi constituído pelas características de volume do ejaculado, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração, anormalidades e perímetro escrotal. Com base no índice de cada touro, dois grupos contrastantes foram selecionados para análise metabolômica: touros superiores ($3,4 \pm 0,2$; $n = 5$) e touros inferiores ($2,1 \pm 0,2$; $n = 5$). Os metabólitos das fezes foram extraídos e os espectros obtidos por meio da análise de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN). Os dados obtidos foram analisados por meio de estatística uni e multivariada para a identificação dos metabólitos diferencialmente expressos. No presente estudo foram observados 54 metabólitos, dos quais 23 foram diferencialmente expressos entre os grupos experimentais de touros com índice de seleção superior e inferior ($P < 0,05$). Os touros com índice superior apresentaram concentrações significativamente maiores ($P < 0,05$) dos compostos acetato, butirato, lactato, piruvato, 3-hidroxiisobutirato, 4-hidroxifenilacetato, histidina, cadaverina, hipoxantina e imidazol. No entanto, nesse grupo experimental foram observadas concentrações significativamente menores ($P < 0,05$) dos metabólitos citrato, formato, isobutirato, isovalerato, fenilacetato, 3-hidroximandelato, glicina, lisina, treonina, glicose, ribose, 1,3-diidroxiacetona e isopropanol. O PCA e PLS-DA mostraram que o perfil de metabólito em touros com índice de seleção superior foi diferente dos touros com índice de seleção inferior. As principais vias metabólicas (maior fator de impacto e $P < 0,05$), observadas foram metabolismo da beta alanina, metabolismo de glicina, serina e treonina, metabolismo do piruvato, metabolismo de glicolipídeos e metabolismo da histidina. Em conclusão, os dados deste estudo piloto mostraram que a impressão digital dos metabólitos das fezes pode ser uma metodologia a ser utilizada no futuro para diferenciar touros superiores e inferiores para reprodução.

Palavras-chave: biotecnologia; *Bos indicus*; metabólitos; reprodução.

IBARRA CARDOZO, Karina Gisselle. **METABOLÓMICA DE LAS HECES DE TOROS NELORE SOMETIDOS A SELECCIÓN.** 48 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue investigar las diferencias en los perfiles metabólicos de las heces de toros seleccionados por medio del índice de selección. Ciento ocho toros de la raza Nelore fueron confinados con la misma dieta durante 77 días. El perímetro escrotal de cada animal fue obtenido, el semen fue colectado y sometido al espermograma. Las muestras de heces fueron colectadas para los ensayos de metabolómica. El índice de selección fue constituido por las características de volumen del eyaculado, torbellino, motilidad, vigor, concentración, anormalidades y perímetro escrotal. Con base en el índice de cada toro, dos grupos contrastantes fueron seleccionados para análisis metabólico: toros superiores ($3,4 \pm 0,2$; $n = 5$) y toros inferiores ($2,1 \pm 0,2$; $n = 5$). Los metabolitos de las heces fueron extraídos y los espectros obtenidos por medio del análisis de Resonancia Magnética Nuclear (^1H RMN). Los datos obtenidos fueron analizados por medio de estadísticas uni y multivariada para la identificación de los metabolitos diferencialmente expresados. En el presente estudio se observaron 54 metabolitos, de los cuales 23 fueron expresados diferencialmente entre los grupos experimentales de toros con índice de selección superior e inferior ($P < 0,05$). Los toros con índice superior presentaron concentraciones significativamente mayores ($P < 0,05$) de los compuestos acetato, butirato, lactato, piruvato, 3-hidroxiisobutirato, 4-hidroxifenilacetato, histidina, cadaverina, hipoxantina e imidazol. Sin embargo, en este grupo experimental se observaron concentraciones significativamente menores ($P < 0,05$) de los metabolitos citrato, forma, isobutirato, isovalerato, fenilacetato, 3-hidroximandelato, glicina, lisina, treonina, glucosa, ribosa, 1,3-dihidroxiacetona e isopropanol. El PCA y PLS-DA mostraron que el perfil de metabolito en toros con índice de selección superior era diferente de los toros con índice de selección inferior. Las principales vías metabólicas (mayor factor de impacto y $P < 0,05$), observadas fueron metabolismo de la beta alanina, metabolismo de glicina, serina y treonina, metabolismo del piruvato, metabolismo de glicolípidos y metabolismo de la histidina. En conclusión, los datos de este estudio piloto mostraron que la huella digital de los metabolitos de las heces puede ser una metodología a ser utilizada en el futuro para diferenciar toros superiores e inferiores para reproducción.

Palabras clave: biotecnología; *Bos indicus*; metabolitos; reproducción.

IBARRA CARDOZO, Karina Gisselle. **FECES METABOLOMICS OF NELORE BULLS SUBMITTED TO SELECTION**. 48 Pages. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate differences in the metabolic profiles of feces of selected bulls applying the selection index. One hundred and eight confined Nelore bulls were on the same diet for 77 days. The scrotal perimeter of each animal was obtained, and semen was collected and submitted to spermograms. Stool samples were obtained for metabolomics assays. The selection index comprised sperm ejaculate volume, turbulence, motility, vigor, concentration, abnormalities, and scrotal circumference. Based on the index of each bull, two differential groups were selected for the metabolomic analyses, namely higher ($3,4 \pm 0,2$; $n = 5$) and lower ($2,1 \pm 0,2$; $n = 5$) bulls. Fecal metabolites were extracted, and spectra were obtained by a Nuclear Magnetic Resonance (^1H RMN) analysis. The obtained data were analyzed employing uni- and multivariate statistics to identify differentially expressed metabolites. A total of 54 metabolites were detected, 23 of which were differentially expressed between the experimental groups comprising bulls with higher and lower selection indices ($P < 0.05$). Bulls displaying higher indices exhibited significantly superior acetate, butyrate, lactate, pyruvate, 3-hydroxyisobutyrate, 4-hydroxyphenylacetate, histidine, cadaverine, hypoxanthine and imidazole concentrations ($P < 0.05$). Significantly less citrate, formate, isobutyrate, isovalerate, phenylacetate, 3-hydroxymandelate, glycine, lysine, threonine, glucose, ribose, 1,3-dihydroxyacetone and isopropanol metabolite concentrations ($P < 0.05$) were detected, however, in this experimental group. A PCA and PLS-DA revealed that the metabolite profile of bulls with higher selection indices was different compared to bulls displaying lower selection indices. The main metabolic pathways (highest impact factor and $P < 0.05$) were the beta alanine, glycine, serine and threonine, pyruvate, glycolipid and histidine metabolisms. In conclusion, the data from this pilot study demonstrate that fecal metabolite fingerprinting may comprise a methodology to be applied to differentiate higher and lower bulls for reproduction purposes in the future.

Key words: biotechnology; *Bos indicus*; metabolites; reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Animais utilizados no presente estudo. A) Touros da raça Nelore confinados no Centro de Inovação em Genética e Nutrição Animal (CIGNA). B) Touros da raça Nelore em baias coletivas equipadas com cochos eletrônicos da empresa Intergado®.

22

Figura 2. Resumo do fluxo de trabalho metabolômico não direcionado usando amostras de fezes de touros Nelore selecionados por meio do índice de seleção.

22

Figura 3. Perfil metabolômico das fezes de touros Nelore. A) Análise de componentes principais (CP) para metabólitos identificados por ^1H NMR (cada ponto corresponde a um touro). B) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial least square-discriminant analysis*; PLS-DA).

31

Figura 4. Correlação dos dados metabolômicos das fezes de touros Nelore (*Bos indicus*) e importância da variável na pontuação da projeção (VIP). A) Cada quadrado representa o coeficiente de correlação de Spearman entre os metabólitos. A ordem do metabólito é determinada como no agrupamento hierárquico. As cores e intensidade indicam a força e a direção das relações significativas ($p < 0,05$); as cores azul e vermelha indicam, respectivamente, correlações positivas e negativas. As autocorrelações são identificadas em vermelho. B) Metabólitos principais (mudança do espectro químico - ppm) selecionados pelo VIP scores ($\text{VIP} > 1,0$).

33

Figura 5. Vias metabólicas associadas à diferenciação entre touros Nelore (*Bos indicus*) inferior e superior. As letras indicam as vias (ver Tabela 2).

34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise descritiva das concentrações de metabólitos (mg/100g de fezes) de touros Nelore (*Bos indicus*). 27

Tabela 2. Resultados da análise das vias metabólicas das fezes de touros Nelore (*Bos indicus*). 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
ABRAFRIGO	Associação Brasileira de Frigoríficos
ACGZ	Associação dos Criadores Gaúchos de Zebu
FIESP	Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PIB	Produto Interno Bruto
PPM	Pesquisa da Pecuária Municipal
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SISCOMEX	Sistemas de Comércio Exterior
UE	União Europeia
USDA	do inglês <i>United States Department of Agriculture</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 AGROPECUÁRIA NACIONAL	14
2.2 A RAÇA NELORE	15
2.3 SELEÇÃO DE BOVINOS REPRODUTORES	17
2.4 ÍNDICE DE SELEÇÃO	18
2.5 METABOLÔMICA APLICADA A PRODUÇÃO ANIMAL	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 PRODUÇÃO DOS ANIMAIS	21
4.2 IMPLEMENTAÇÃO DOS ÍNDICES DE SELEÇÃO E SEPARAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	23
4.3 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS E AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS 1H RMN	23
4.4 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE 1H RMN	23
4.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS	24
4.6 PROCESSAMENTO DE DADOS	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5 CONCLUSÃO	38
6 REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O Brasil encabeça o ranking mundial de maior exportador de carne bovina desde 2008 e as estatísticas mostram crescimento ao longo dos anos (MAPA, 2015). Em 2018, o Brasil foi responsável por 20% das exportações mundiais de carne, tornando-se o maior exportador de carne bovina do mundo. Estima-se que para o ano 2028 o país será responsável por 23% das exportações globais (USDA, 2018).

Deste modo, a pecuária de corte no Brasil tem papel de destaque no Produto Interno Bruto (PIB) nacional que se fortalece a cada ano, só em 2019 a bovinocultura foi responsável por R\$ 618,50 bilhões, isto é 8,5% do PIB total. Desse modo, sua importância social e econômica fica evidente (ABIEC, 2020). Além disso, a raça Nelore é de suma importância na bovinocultura de corte no país, principalmente, devido a adaptação ao clima tropical, resistência a parasitas, adaptação ao sistema extensivo de produção e adequado desempenho produtivo e reprodutivo (CÔNSOLO et al., 2016).

O aumento acelerado do rebanho bovino no país foi graças à busca de novas tecnologias em nutrição, pastagem, manejo sanitário e principalmente genética. A busca por melhorar e aumentar a produção fez com que os reprodutores superiores fossem selecionados para contribuir com a genética de características desejadas geração após geração (MALAFAIA et al., 2021).

O melhoramento genético auxilia nas características fenotípicas desejáveis, onde a seleção dos indivíduos pode aumentar a frequência de genes de interesse (MPENDA et al., 2019). Sendo assim, a qualidade do sêmen dos touros possui importante papel na seleção desses animais, obtenção do progresso genético e aumento da produtividade do rebanho (HÁRMORI, 1983). Neste cenário, o índice de seleção fenotípica é ferramenta para selecionar várias características, ao mesmo tempo, e pode ser implantada para avaliar a qualidade do sêmen dos touros. No entanto, a avaliação da capacidade reprodutiva do macho somente se completa com o exame espermático.

Neste contexto, as fezes podem ser úteis na identificação precoce de reprodutores férteis, no intuito de identificar os touros com elevado

potencial reprodutivo por meio de bioamostras não invasivas, o que evita o estresse e não interfere no desempenho dos animais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil dos metabólitos das fezes de touros da raça Nelore submetidos a seleção.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AGROPECUÁRIA NACIONAL

No cenário mundial do agronegócio, a pecuária apresenta grande relevância para alimentação humana e obtenção de produtos (INDIGO, 2021). O rebanho bovino universal hoje é composto por 983,3 milhões de cabeças, concentrados principalmente em sete países, como Índia, Brasil, Estados Unidos, China, União Europeia, Argentina e Austrália (CAETANO, 2019; MALAFAIA et al., 2021). Segundo o *United States Department of Agriculture* (USDA) os maiores produtores de bovinos são Estados Unidos, Brasil, União Europeia e China com 20,1%, 16,6%, 12,8% e 10,8%, respectivamente (USDA, 2020).

No Brasil, conforme resultados da Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) 2019 a distribuição do rebanho regional está concentrada principalmente em três estados do país, os quais representam 35,7% na produção total de bovinos. Em primeiro lugar, o estado do Mato Grosso que concentra 14,8% do rebanho, seguido pelos estados de Goiás e Minas Gerais, sendo este último o principal produtor de bovinos de leite no Brasil (IBGE, 2020).

A bovinocultura exerce um papel notável na economia nacional, responsável por 8,5% do PIB total, que foi de R\$ 7,3 trilhões (ABIEC, 2020). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2020) o número de cabeças de bovinos aumentou 26% entre os anos 2000 e 2019, isto é, passou de 169,89 milhões para 213,7 milhões de cabeças.

Devido a este fato, o Brasil é um dos principais produtores de carne bovina, pois possui o segundo maior rebanho do mundo e o primeiro maior rebanho comercial (ANDRADE et al., 2009; IBGE, 2020). Além disso, no país foram abatidas 43,3 milhões de cabeças em 2020, representado por 24% da sua produção, e exportadas o equivalente a 1.846 mil toneladas de carcaças, onde os principais destinos foram China, Hong Kong, Egito, Chile e a União Europeia, os quais importaram 26,7%, 18,5%, 8,9%, 5,9% e 5,7% respectivamente (ABRAFRIGO, 2020; ABIEC, 2020). Este montante, gerou para a receita nacional um total de US \$5,3 bilhões (SISCOMEX, 2020). Assim, o Brasil se tornou o principal exportador de carne bovina e as projeções indicam que o país seguirá tendo importância como fornecedor

de carne bovina para satisfazer a crescente demanda mundial (FIESP, 2020).

A exportação para a União Europeia não parece ser muito relevante em comparação a regiões como a China ou Hong Kong. No entanto, este fato se deve a cota Hilton (MIRANDA, 2011). De acordo com a ABIEC, a cota Hilton “é uma determinada quantidade de carne bovina fresca ou resfriada, de cortes traseiros, sem ossos e com alto padrão de qualidade, destinada à exportação para a União Europeia” cuja parcela brasileira permitida é de 10 mil toneladas anuais (ABIEC, 2016; FGVces, 2018). Além disso, os pecuaristas nacionais devem cumprir uma série de especificações de qualidade e sanidade além da boa produção animal para favorecer as importações e, conseqüentemente, receber melhor remuneração nos preços pagos pela arroba (LAMOSO, 2011; MIRANDA, 2011). Deste modo, em relação a Cota Hilton, o Brasil se encontra credenciado com o limite de exportações e cerca de 85,7% deste total foi atendido no ano de 2020.

2.2 A RAÇA NELORE

Da totalidade do rebanho bovino brasileiro aproximadamente 80% dos animais pertencem às raças zebuínas, dos quais 90% corresponde a raça Nelore, constituindo assim a maioria genética no país (ABIEC, 2020). Essa raça representa um dos primeiros animais *Bos indicus* importados para o Brasil (CORRÊA DA SILVA et al., 2017). A multiplicação e predominância desse zebu no país deve-se principalmente à rusticidade e fácil adaptação ao clima tropical brasileiro de elevadas temperaturas, e alta tolerância a parasitas internos e externos. Além disso, os bovinos Nelore possuem adaptação ao sistema extensivo de criação, devido à baixa exigência alimentar, capacidade de digerir fibras de baixa qualidade, baixo metabolismo e elevado desempenho produtivo e reprodutivo, quando comparado aos animais *Bos taurus* (OLIVEIRA et al., 2002; MACEDO, 2006).

Na atualidade os bovinos de corte presentes no Brasil conformam 165 milhões de cabeças, dos quais 100 milhões pertencem aos zebuínos da raça Nelore de acordo com os dados fornecidos pela Associação dos Criadores Gaúchos de Zebu (ACGZ) (ACGZ, 2013).

A raça Nelore é originária de uma província do sul da Índia, atualmente conhecida como Andhra Pradesh, estes zebus foram importados do oriente médio

para o Brasil no transcorrer do século XIX ao século XX com o intuito de introduzir animais com características fenotípicas relevantes para a caracterização, conformação e melhoramento do rebanho nacional (LACERDA, 2013; SANTOS, 2017). No entanto, outro fator importante para a vertiginosa propagação desta raça no Brasil foram os programas de melhoramento genético implementados no decorrer do tempo, o que permitiu a identificação e seleção de animais mais produtivos para multiplicação nos rebanhos comerciais (VIANA, 2019).

Na década de 80, o Brasil organizou o primeiro programa de melhoramento genético de touros da raça Nelore. Atualmente, existem no país 10 programas para esta raça, os quais têm coletado dados fenotípicos e informações genômicas para as avaliações genéticas e seleção dos touros (CARVALHEIRO, 2014).

Deste modo, Albuquerque et al. (2007, p. 340) afirmam que a carne de animais zebuínos tem ganhado espaço mundialmente, e este fato preconiza a importância dos países tropicais e subtropicais na produção de alimentos. No entanto, a grande variedade dos sistemas produtivos de gado zebu, dificulta o objetivo de seleção. Assim, segundo Alencar (2004), a intensificação dos sistemas de produção deve ser realizada, no intuito de direcionar a seleção da raça Nelore. Além disso, outro fato que também limita o melhoramento do Nelore é a alta prevalência de ectoparasitas, onde os carrapatos acarreta em graves problemas econômicos para pecuária (ALBUQUERQUE et al., 2007; ANDREOTTI et al., 2019; RODRÍGUEZ-VIVAS, 2014).

Para a pecuária nacional os bovinos Nelore são altamente relevantes devido não só aos seus atributos produtivos, mas também pelas características reprodutivas (SOUSA et al., 2012). Entre as características produtivas, são de interesse o peso ao nascimento, peso ao desmame e peso em diferentes idades do animal, já nas características reprodutivas são consideradas a idade da primeira concepção e do primeiro parto e intervalo entre partos, características ligadas à precocidade das fêmeas (BARBOSA, 1999; SILVEIRA et al., 2004). Deste modo, a eficiência reprodutiva dos animais também merece destaque, uma vez que possui grande importância dentro dos programas de melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil.

2.3 SELEÇÃO DE BOVINOS REPRODUTORES

As características reprodutivas e de crescimento são consideradas as mais importantes para melhoramento genético efetivo, assim, existem diversos parâmetros que devem ser considerados na escolha dos animais selecionados como reprodutores, tais como crescimento, reprodução e qualidade da carcaça de bovinos (ABREU et al., 2018; ZUIN et al., 2012). Segundo Guimarães (2016, p. 15), é de extrema necessidade que os programas de melhoramento conheçam os parâmetros fenotípicos, genéticos e ambientais das características de importância econômica, uma vez que a seleção animal é uma excelente ferramenta para a população bovina.

A seleção é considerada um dos pilares do melhoramento genético animal e possui função importante no intuito de aumentar a produtividade. Os programas de melhoramento utilizam os índices de seleção de acordo com o interesse econômico e realizam os acasalamentos dirigidos no intuito de aumentar a produção. Além disso, permite o aumento do ganho genético (diferença entre a média fenotípica dos descendentes pela média da população parental) para as características de interesse (CARVALHEIRO, 2014). Deste modo, para aumentar a eficiência e produtividade de rebanhos de bovinos, se torna imprescindível a aplicação de técnicas de melhoramento genético, no intuito de selecionar os reprodutores da próxima geração (MOREIRA, 2011).

Atualmente as biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial tem auxiliado no melhoramento genético dos bovinos de corte. O Brasil apresenta 17,8% das matrizes de gado de corte inseminadas artificialmente, o que demonstra um avanço significativo na utilização dessa tecnologia (BARUSELLI et al., 2019). Deste modo, o uso da inseminação artificial, torna o sistema de produção de bovinos de corte cada vez mais eficiente, além de proporcionar ao rebanho o melhoramento animal, uma vez que são utilizados touros geneticamente superiores.

As características reprodutivas dos touros são economicamente relevantes, com grande potencial na melhoria da rentabilidade do sistema de produção (BRUMATTI et al., 2011). A fertilidade dos touros pode ser mensurada por meio de medidas biométricas como o perímetro escrotal, sendo realizada de maneira simples e rápida. Além disso, essas características possuem alta correlação com os parâmetros produtivos e reprodutivos dos touros (BARROS JÚNIOR et al., 2016). As

características físicas e morfológicas do sêmen também apresentam grande importância, onde os animais que apresentam os parâmetros adequados são utilizados como reprodutores (ALCANTARA, 2017). Portanto, o sucesso das técnicas reprodutivas e do melhoramento genético e índices reprodutivos do rebanho depende significativamente da fertilidade dos touros (MENEZES, 2019).

2.4 ÍNDICE DE SELEÇÃO

A aplicação do índice de seleção é uma prática antiga, pecuaristas utilizavam características fenotípicas como diâmetro escrotal, peso, precocidade sexual, estrutura corporal, entre outras com o propósito de selecionar os melhores reprodutores para a próxima geração (HAZEL, 1943).

O índice de seleção agrega distintas características de interesse econômico e permite predizer o mérito genético dos indivíduos (BOURDON, 2000; CUNNINGHAM & TAUEBERT, 2009). Na composição do índice, os fenótipos são divididos pelo desvio padrão de cada característica e ponderado pelo valor econômico. A fórmula utilizada para obter o índice pode ser representada por $I = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$, onde x corresponde ao valor fenotípico do animal para a característica n , e b é o ponderador das características.

Segundo Ferraz Filho (2002) a interação entre manejo, nutrição e seleção podem ocasionar em aumento do progresso genético dos animais, sendo necessária a manipulação assertiva entre as características avaliadas e selecionadas. Portanto, faz-se necessário a definição de quais características são de suma importância para determinar os métodos de seleção (apud RODRIGUES, 2020, p. 27).

De acordo com Marques et al. (2012) a escolha de múltiplas características a partir de índices de seleção é a maneira mais rápida e eficiente de melhorar o valor genético agregado, pois utiliza uma grande quantidade de informação de várias características para produzir um valor único.

2.5 METABOLÔMICA APLICADA A PRODUÇÃO ANIMAL

Os estudos de “ômica” em larga escala podem ser realizados no intuito de obter uma visão holística dos processos que ocorrem em um sistema dinâmico

(SMIRNOV et al., 2016). Este termo é utilizado para designar genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, entre outras. Além disso, podem otimizar as predições genéticas e viabilizar a inclusão de novas características em programas de melhoramento, o que permite predizer o mérito genético com maior confiabilidade e a redução do intervalo de geração (GODDARD & HAYES, 2002; BOICHARD et al., 2016).

A metabolômica, tecnologia recente entre as “ômicas”, pode ser definida como uma análise abrangente que utiliza técnicas avançadas de química analítica e possui capacidade de detectar e quantificar rapidamente centenas/milhares de metabólitos em células, tecidos e biofluidos (GOLDANSAZ et al., 2017). Os metabólitos são efetivamente os produtos finais de interações entre o genoma e o meio ambiente, possibilitando descrever com maior precisão o fenótipo (FONTANESI, 2016). Além disso, essa tecnologia em desenvolvimento tenta explicar as vias metabólicas envolvidas na produção de metabólitos específicos (KIM et al., 2021).

A metabolômica utiliza principalmente tecnologias de análise como a ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). A RMN é uma técnica de detecção poderosa para o perfil não direcionado de biomarcadores de metabólitos incluindo uma detecção, caracterização e quantificação rápida (FONTANESI, 2016; SERKOVA et al., 2019).

Na produção animal, a metabolômica tem sido utilizada para investigar a magnitude do controle genético nos perfis metabolômicos dos animais e suas relações com distintos fenótipos de importância para o melhoramento animal (ALIAKBARI et al., 2019).

No entanto, dentre as bioamostras são poucos os estudos sobre metabólitos fecais em bovinos (VALERIO et al., 2019; ZHU et al., 2019; MALHEIROS et al., 2021), mesmo sendo evidente que é mais fácil acessar amostras fecais durante as rotinas de produção animal. Portanto, a identificação de possíveis vias metabólicas e biomarcadores nas fezes teria grande potencial para aplicações práticas. Neste contexto, as fezes podem ser úteis na caracterização de metabólitos e na possível identificação de biomarcadores, no intuito de identificar os touros com elevado potencial reprodutivo para serem os pais da próxima geração.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil dos metabólitos (*untargeted metabolomics*) das fezes de touros da raça Nelore (*Bos indicus*) submetidos a seleção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar os índices de seleção para os bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) utilizando as características reprodutivas;
- Classificar e selecionar os touros superiores (n = 5) e inferiores (n = 5) de acordo com os índices de seleção;
 - Identificar e quantificar os metabólitos por meio da análise dos espectros de ^1H RMN;
 - Comparar o perfil metabólico (*untargeted metabolomics*) das fezes de bovinos Nelore superiores e inferiores por meio da análise uni e multivariada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DOS ANIMAIS

O experimento foi realizado no Centro de Inovação em Genética e Nutrição Animal (CIGNA), localizado na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Botucatu, SP, situado a 22°53'09” de latitude sul e 48°26'42” de longitude oeste, em sistema de baias coletivas equipadas com cochos eletrônicos da empresa Intergado® (Intergado Ltda., Contagem, Minas Gerais, Brasil).

Foram utilizados 108 touros da raça Nelore com idade média de 18 meses (\pm 550 dias), divididos em quatro baias (27 animais por baia) provenientes de propriedades situadas nos Estados de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais, participantes do Programa de Melhoramento Genético Nelore Qualitas®.

Os animais foram confinados e submetidos ao período de adaptação à dieta/instalações por 21 dias e posteriormente submetidos ao teste propriamente dito por 56 dias, com acesso *ad libitum* à dieta e água. Os animais receberam a dieta duas vezes ao dia (08:00h e 16:00h), formulada no programa *Large Ruminant Nutrition System v.1.0.3.3* (LRNS) e composta por silagem de milho (27,58%), bagaço de cana (4,89%), milho grão úmido (44,64%), farelo de amendoim (8,01%), polpa cítrica (11,94%), uréia (1,16%), Premix mineral (1,78%).

Após o período experimental, o perímetro escrotal foi obtido e o sêmen de cada touro foi coletado e enviado para realização do espermograma. Além disso, amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada bovino, imergidas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C para os ensaios de metabólica.



Figura 1. Animais utilizados no presente estudo. A) Touros da raça Nelore confinados no Centro de Inovação em Genética e Nutrição Animal (CIGNA). B) Touros da raça Nelore em baias coletivas equipadas com cochos eletrônicos da empresa Intergado®.

Fonte: Centro de Inovação em Genética e Nutrição Animal (CIGNA).

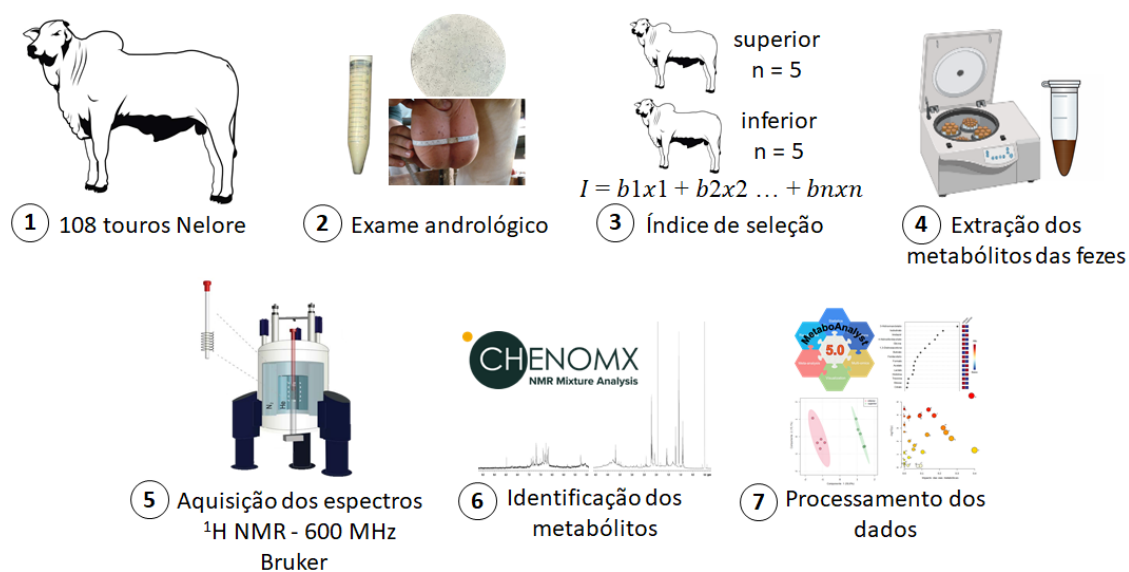


Figura 2. Resumo do fluxo de trabalho metabolômico não direcionado usando amostras de fezes de touros Nelore selecionados por meio do índice de seleção.

4.2 IMPLEMENTAÇÃO DO ÍNDICE DE SELEÇÃO FENOTÍPICA E SEPARAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

O índice de seleção foi constituído pelas características de volume do ejaculado, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e anormalidades. Para formação do índice de seleção, os valores dos fenótipos foram divididos pelo desvio padrão, no intuito de eliminar as distintas unidades de medida, de acordo com a seguinte equação.

$$\text{Índice} = 0,15\text{PE} + 0,12\text{VE} + 0,12\text{TU} + 0,12\text{MO} + 0,12\text{VI} + 0,12\text{CO} - 0,25\text{AN}$$

Onde: PE = perímetro escrotal (cm); VE = volume do ejaculado (mL); TU = turbilhonamento (0-5); MO = motilidade (%); VI = vigor (0-5); CO = concentração ($\times 10^3/\text{mm}^3$); AN = anormalidades (%).

Com base no índice de seleção de cada touro, dois grupos contrastantes foram selecionados para análise metabólica: touros superiores ($3,4 \pm 0,2$; $n = 5$) e touros inferiores ($2,1 \pm 0,2$; $n = 5$). Os touros superiores apresentaram média e desvio padrão de $38,0 \pm 2,1$; $8,3 \pm 3,4$; $4,5 \pm 0,6$; $76,2 \pm 4,8$; $4,5 \pm 0,6$; $707,5 \pm 271,5$; $14,2 \pm 2,9$ e os touros do grupo inferior apresentaram valores de $36,5 \pm 3,1$; $6,2 \pm 2,4$; $2,75 \pm 1,5$; $68,7 \pm 2,5$; $4,0 \pm 0,0$; $575 \pm 161,7$; $17,5 \pm 2,6$ para as características de PE, VE, TU, MO, VI, CO e NA, respectivamente.

4.3 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS E AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS ^1H RMN

Aproximadamente 300 mg de fezes de cada animal ($n = 10$) foi homogeneizada com o tampão de fosfato de sódio em óxido de deutério (0,10 M, pD 7,4) contendo 0,050% de 3-trimetilsilil-2,2,3,3-d₄-propionato de sódio de padrão químico de deslocamento interno (TMSP-d₄, SigmaAldrich). Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 xg por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. O volume de 600 uL de sobrenadante:óxido de deutério (3:1 vol/vol) foi adicionado em um tubo de RMN de 5 mm (MALHEIROS et al., 2021).

4.4 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE ^1H RMN

Os espectros por ^1H RMN foram adquiridos a 298 K em um espectrômetro de 14 T Bruker Avance III (Bruker BioSpin, Alemanha) equipado com uma cabeça de sonda PABBO de 5 mm. Primeiramente um protocolo foi estabelecido para todas as amostras de controle de qualidade (QC) constituída por um *pool* de alíquotas dos extratos metabólicos de fezes (pulso de 90° calibrado e irradiação na frequência da água), e então este protocolo foi realizado em modo totalmente automático usando a rotina Bruker (carga, sintonia automática, travamento, fase, *shimming*, aquisição e processo) por interface ICON-NMR (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

Os espectros foram adquiridos para próton RMN utilizando pulso de 90° (sequência zg), 64 K *data points*, com uma largura espectral de 20,0276 ppm e um tempo de aquisição *d1* de 2,726 s. Foram adquiridos um ganho de 225, um atraso de reciclagem de 1 seg (*delay*), varredura de 0 (*scans*) e um acúmulo de *ns* = 16 *transients*. A supressão da água foi obtida pela sequência de pulsos denominada 1D NOESY (Bruker 1D noesygppr1d), utilizando os mesmos dados. Os FIDs foram multiplicados por uma função de multiplicação exponencial de 0,3 Hz antes da transformação de *Fourier*, somente uma correção de fase de ordem zero será permitida, e o sinal de TMS- d_4 será calibrado em $\delta = 0,00$ ppm por meio do software Topspin Versão 3.6 para análise de RMN (Bruker Inc., Karlsruhe, Alemanha). Os experimentos de RMN bidimensional com as aquisições *J-resolved* (JRES) RMN, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^1H COSY foram realizados em amostras selecionadas.

4.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

Os espectros obtidos por meio do ^1H RMN dos animais selecionados por meio dos índices de seleção foram analisados. A identificação dos metabólitos foi realizada através do software Chenomx NMR Suite 8.2 (Chenomx, Edmonton, Canada). Os metabólitos identificados também foram definidos com base em bancos de dados públicos como *Human Metabolome Database* (HMDB, <http://www.hmdb.ca>) e o *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB, www.bmrb.wisc.edu).

A quantificação foi realizada por meio da integral dos picos dos

metabólitos individuais em relação ao sinal de *Electronic reference to access concentrações in vivo* (ERETIC), realizado usando um padrão de sacarose 2 mM com ganho de receptor para as amostras.

4.6 PROCESSAMENTO DE DADOS

Os dados de ^1H RMN foram agrupados (*binning*) a cada 0,04 ppm e transformados em uma matriz de dados, usando o *software* MNova da MestReLab Research (www.mestrec.com). Posteriormente, os dados foram analisados na plataforma MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) por meio de análise de componentes principais (PCA), análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) e importância variável na projeção (VIP score), no intuito de identificar os metabólitos diferencialmente expressos ($P < 0,05$), conforme método proposto por XIA et al. (2009) e XIA et al. (2011).

A análise das vias metabólicas foi realizada utilizando o banco de dados da espécie *Bos taurus*. A identificação e visualização de diferentes atuações das vias metabólicas foram baseadas no *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.genome.jp/kegg/>). Os diagramas de rede foram construídos entre os metabólitos e o fator de impacto das análises topológicas das vias metabólicas foi apresentado graficamente usando o MetaboAnalyst 5.0 (XIA et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente estudo investigamos os perfis metabólicos das fezes de touros separados em dois grupos experimentais, superior e inferior para o índice de seleção fenotípica, por meio da análise metabolômica não direcionada, bem como ferramentas estatísticas e de bioinformática.

O perfil metabolômico das fezes de touros da raça Nelore (*Bos indicus*) foram analisados por ¹H RMN. No perfil foram identificados e quantificados 54 metabólitos, sendo 44,4% ácidos orgânicos, 24,1% aminoácidos, 7,4% nucleotídeo/purina/piridina, 7,4% álcool, 5,6% açúcares, 5,6% aminas, já os sais, alcalóides e cetonas contribuíram com 1,85% cada grupo (Tabela 1). Os metabólitos mais abundantes, presentes nas fezes dos touros Nelore de ambos os grupos experimentais, foram os ácidos graxos voláteis que incluem acetato, butirato e propionato, seguido do valerato.

Apesar da escassez literária disponível sobre metabólitos fecais de bovinos (ZHU et al., 2019; VALEIRO et al., 2020; MALHEIROS et al., 2021). Alguns dos metabólitos diferencialmente expressos observados neste estudo (4-hidroxibutirato, 4-hidroxi-3-metoximandelato, histidina e imidazol) foram identificados pela primeira vez no estudo de Malheiros et al. (2021), onde os autores também observaram os metabólitos das fezes de bovinos da raça Nelore.

Além disso, observamos uma ampla variedade de compostos envolvidos em múltiplos processos metabólicos. No entanto, os ácidos graxos de cadeia curta como acetato, propionato e butirato apresentaram maiores concentrações, uma vez que estes metabólitos são os principais produtos da fermentação de fibra no rúmen, o qual desempenha um papel importante na obtenção de energia oriunda das plantas (LIANG et al., 2016). Segundo Seymour et al. (2005) aproximadamente 70% das necessidades energéticas do animal são proporcionadas por ácidos graxos de cadeia curta. Além disso, Shabat et al. (2016) demonstraram no estudo com vacas leiteiras que altas concentrações do metabólito acetato indicam alta eficiência do animal.

Tabela 1. Análise descritiva das concentrações de metabólitos (mg/100g de fezes) de touros Nelore (*Bos indicus*).

Metabólitos	ID^a	Inferior^b	Superior^b	p-valor^c
Ácido orgânico derivado				
Acetato	HMDB00087	54,161 ± 7,846	124,144 ± 17,134	0,0003
Butirato	HMDB00131	7,584 ± 2,186	31,350 ± 2,481	<,0001
Citrato	HMDB01525	0,212 ± 0,047	0,079 ± 0,017	0,0018
Formato	HMDB00863	0,165 ± 0,009	0,063 ± 0,003	0,0459
Isobutirato	HMDB00164	1,455 ± 0,167	0,520 ± 0,101	0,0009
Isovalerato	HMDB00237	1,464 ± 0,240	0,877 ± 0,190	0,0238
Lactato	HMDB00243	0,387 ± 0,103	0,979 ± 0,105	0,0002
Fenilacetato	HMDB00892	0,713 ± 0,191	0,184 ± 0,063	0,0019
N-Acetilaspártato	HMDB00300	0,213 ± 0,142	0,172 ± 0,044	0,5929
Propionato	HMDB00883	24,991 ± 13,377	32,761 ± 9,079	0,3735
Piruvato	HMDB00292	0,153 ± 0,023	0,288 ± 0,019	0,0054
Succinato	HMDB01149	0,648 ± 0,503	0,476 ± 0,391	0,6083
Valerato	HMDB00161	3,073 ± 1,474	3,745 ± 0,861	0,4605
Timol	HMDB00042	0,327 ± 0,170	0,405 ± 0,323	0,6842
2-Hidroxiisovalerato	HMDB01149	0,310 ± 0,174	0,311 ± 0,066	0,9899
2-Hidroxi valerato	HMDB00450	0,533 ± 0,343	0,445 ± 0,155	0,6572
3-Hidroxi butirato	HMDB00042	0,405 ± 0,149	0,568 ± 0,270	0,3315
3-Hidroxi isobutirato	HMDB01659	0,737 ± 0,319	1,474 ± 0,357	0,0217
3-Hidroxi isovalerato	HMDB00161	0,274 ± 0,192	0,307 ± 0,166	0,8019
3-Hidroxi mandelato	HMDB00517	0,313 ± 0,049	0,047 ± 0,013	0,0216
3-Hidroxi fenilacetato	HMDB00039	0,291 ± 0,124	0,264 ± 0,050	0,7015
3-Fenilpropionato	HMDB02322	0,313 ± 0,180	0,264 ± 0,171	0,7042
4-Hidroxi fenilacetato	HMDB01847	0,361 ± 0,015	1,121 ± 0,046	0,0178
5-Hidroxi lisina	HMDB00094	0,404 ± 0,294	0,490 ± 0,213	0,6519
Aminoácido				
Alanina	HMDB00142	0,470 ± 0,259	0,551 ± 0,183	0,6302
Arginina	HMDB00122	0,480 ± 0,141	0,480 ± 0,175	0,9981
β-alanina	HMDB02322	0,071 ± 0,039	0,087 ± 0,054	0,6463
Glicina	HMDB00687	0,247 ± 0,007	0,073 ± 0,004	0,0184
Histidina	HMDB00182	0,224 ± 0,073	0,590 ± 0,076	0,0059
Isoleucina	HMDB00812	0,377 ± 0,175	0,397 ± 0,070	0,8346

Leucina	HMDB00283	0,286 ± 0,147	0,325 ± 0,112	0,6916
Lisina	HMDB00271	1,034 ± 0,281	0,482 ± 0,095	0,0307
Metionina	HMDB00167	0,168 ± 0,095	0,169 ± 0,123	0,9916
Sarcosina	HMDB00020	0,046 ± 0,022	0,044 ± 0,009	0,8976
Treonina	HMDB00450	0,811 ± 0,089	0,225 ± 0,078	0,0007
Valina	HMDB00517	0,140 ± 0,068	0,125 ± 0,042	0,7180
5-Aminolevulinato	HMDB00097	1,084 ± 0,171	1,462 ± 0,195	0,2127
Açúcar				
Glicose	HMDB00718	6,296 ± 0,532	2,831 ± 0,450	0,0167
Ribose	HMDB00056	3,583 ± 0,502	0,887 ± 0,069	0,0116
1,3-Diidroxiacetona	HMDB00020	0,048 ± 0,007	0,017 ± 0,001	0,0001
Aminas				
Cadaverina	HMDB00123	0,149 ± 0,020	0,333 ± 0,129	0,0301
Dimetilamina	HMDB01873	0,020 ± 0,006	0,023 ± 0,006	0,4440
Metilamina	HMDB01878	0,152 ± 0,030	0,142 ± 0,086	0,8288
Sais de amônio quaternários				
Colina	HMDB00157	0,048 ± 0,022	0,058 ± 0,010	0,4671
Nucleotídeo / Purina / Piridina				
Cafeína	HMDB00177	0,040 ± 0,020	0,036 ± 0,011	0,7762
Hipoxantina	HMDB01875	0,037 ± 0,027	0,132 ± 0,023	0,0097
Uracil	HMDB01659	0,237 ± 0,179	0,202 ± 0,123	0,7594
Xantina	HMDB00039	0,089 ± 0,052	0,069 ± 0,020	0,4951
Alcalóide				
Imidazol	HMDB00696	0,051 ± 0,014	0,167 ± 0,012	0,0024
Álcool				
Etanol	HMDB00172	2,221 ± 1,405	2,837 ± 1,856	0,6156
Glicerol	HMDB00190	0,539 ± 0,090	0,582 ± 0,151	0,6414
Isopropanol	HMDB00209	0,293 ± 0,023	0,128 ± 0,049	0,0480
Metanol	HMDB00254	0,077 ± 0,018	0,090 ± 0,023	0,4408
Cetonas				
Acetona	HMDB00108	0,053 ± 0,033	0,046 ± 0,023	0,7404

^aID Human Metabolome Database (HMDB, <http://www.hmdb.ca>).

^bMédia ± desvio padrão.

^cp-valor corresponde ao valor original calculado a partir da análise de enriquecimento.

No presente estudo, 23 metabólitos foram diferencialmente expressos entre os grupos experimentais de touros com índice de seleção superior e inferior ($P < 0,05$). Os touros superiores apresentaram maior concentração dos metabólitos acetato, butirato, lactato, piruvato, 3-hidroxiisobutirato, 4-hidroxifenilacetato, histidina, cadaverina, hipoxantina e imidazol, quando comparado aos touros inferiores ($P < 0,05$). No entanto, o citrato, formato, isobutirato, isovalerato, fenilacetato, 3-hidroxi mandelato, glicina, lisina, treonina, glicose, ribose, 1,3-diidroxiacetona e isopropanol mostraram maior concentração no grupo experimental inferior ($P < 0,05$). Deste modo, a análise metabolômica foi capaz de detectar distintas concentrações dos metabólitos entre os grupos experimentais de touros da raça Nelore.

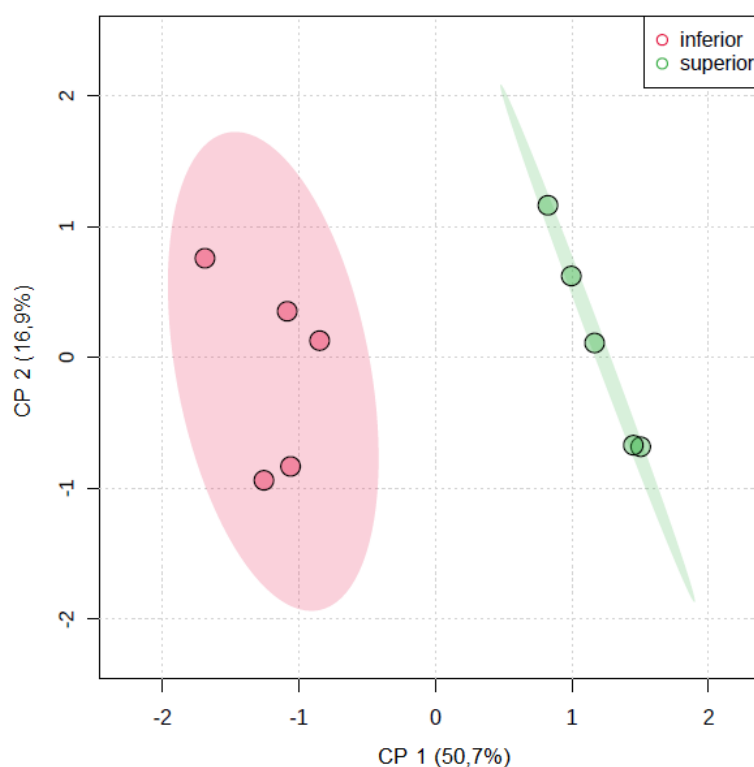
Os açúcares fazem parte do metabolismo de diversas substâncias, no metabolismo espermático a glicose tem protagonismo pela sua relação com a via Embden-Meyerhof onde é utilizada como substrato (VASCONCELOS, 2009). Segundo o trabalho de Inskeep e Hammerstedt (1983) o aumento exorbitante nas concentrações deste açúcar seguido da diminuição das concentrações de oxigênio disponível indicam o aparecimento do efeito conhecido como “efeito glicose” que é prejudicial às células espermáticas em consequência da baixa manutenção da mobilidade e suporte no processo de balanço iônico em consequência do favorecimento do processo de fermentação. Deste modo, este fato pode explicar as altas concentrações de açúcar nos touros do grupo inferior.

Por outro lado, a ribose foi uns dos metabólitos que mostrou maior concentração no grupo de touros inferiores. Esse açúcar sofre uma reação irreversível na via da pentose fosfato, formando intermediários que estão interligados à via da glicólise. É encontrado em todas as células vivas e é vital para a vida já que é precursor de nucleotídeos e ácidos nucleicos. Em recente estudo, Pessoa (2021) afirmou que este açúcar 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.

A análise de componentes principais (CP) e a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram usadas para visualizar as diferenças nos perfis de metabólitos entre os dois grupos experimentais (Figura 3A, B). Os dois primeiros componentes principais do PCA explicaram 67,6% da

variância total dos dados. Do mesmo modo, o PLS-DA demonstrou uma cobertura de 65,7% definida pelos dois primeiros componentes. Além disso, a validação cruzada observada pela acurácia = 1,0, Q2 = 0,92, R2 = 0,96 (componente 1) e acurácia = 1,0, Q2 = 0,95, R2 = 0,99 (componente 2), sugerem diferenças entre grupos experimentais, o que pode ser observado pela evidente separação entre touros com índice superior e inferior. Assim, a metabolômica fecal traz indícios para ser utilizada de maneira eficiente como um novo método não invasivo para seleção de reprodutores.

As correlações positivas de elevada magnitude ($> 0,7$) ocorreram entre os metabólitos acetato, butirato, lactato, piruvato, cadaverina e 4-hidroxifenilacetato (Figura 4A). Estes metabólitos também apresentaram correlação superior a 0,55 com os metabólitos hipoxantina e histina. Correlações positivas de elevada magnitude ($> 0,6$) também foram observadas entre os metabólitos citrato, formato, isobutirato, fenilacetato, glicina, ribose, isopropanol, glucose, treonina e 1,3-dihidroxiacetona. No entanto, estes compostos mostraram média à alta correlação ($> 0,4$) com acetato, butirato, lactato, piruvato, hipoxantina, 4-hidroxifenilacetato, imidazol e histidina.



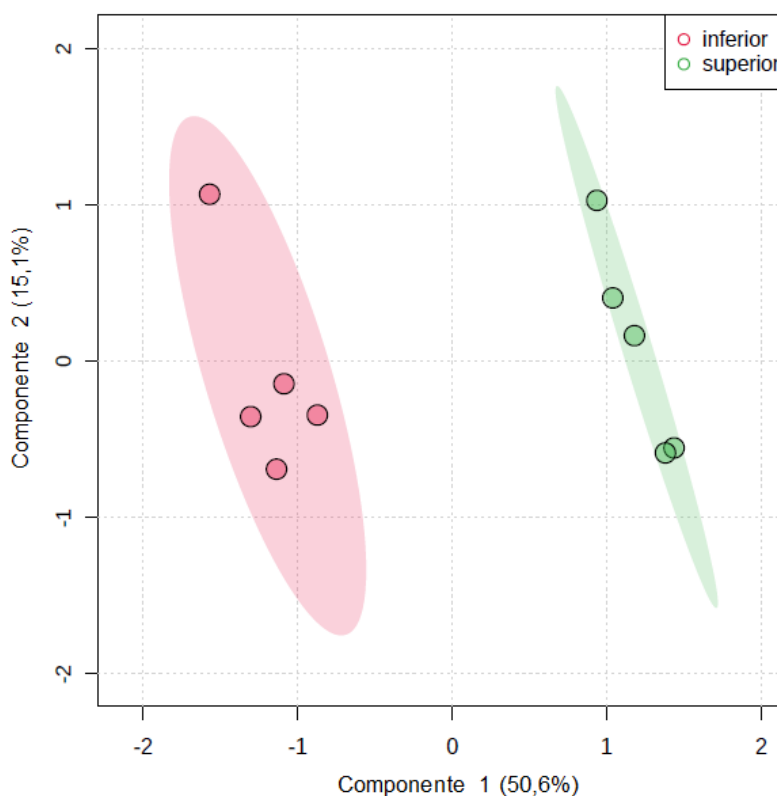


Figura 3. Perfil metabólico das fezes de touros Nelore. A) Análise de componentes principais (CP) para metabólitos identificados por ^1H NMR (cada ponto corresponde a um touro). B) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial least square-discriminant analysis*; PLS-DA).

Os 15 metabólitos influentes presentes nas fezes foram observados por meio do VIP score, e discriminaram os perfis dos touros superiores e inferiores (Figura 4B). Baseado nos metabólitos e análises VIP, os compostos mais importantes que diferem entre os animais do grupo inferior e superior incluíram (por ordem de importância) o 3-hidroxiandelato, isobutirato, imidazol, 4-hidroxifenilacetato, glicina, 1,3-diidroxiacetona, butirato, fenilacetato, formato, acetato, lactato, histidina, treonina, ribose e citrato. O 3-hidroxiandelato apresentou concentração de 6,6 vezes maior no grupo inferior. A concentração do butirato no grupo superior foi 4 vezes maior que a do grupo inferior. Os demais compostos foram uma, duas ou três vezes maiores em um dos grupos experimentais, quando comparado ao outro.

Dentre os metabólitos expressos em maior quantidade, o butirato tem papel fundamental na estimulação do oxaloacetato para utilização no ciclo do ácido cítrico além de ser utilizado pelos tecidos do corpo em situações de estresse e

restrição de nutrientes (SCHULMEISTER et al., 2020). Com base nos resultados do presente estudo, a metabolômica fecal baseada em ^1H RMN pode fornecer um melhor entendimento do estado fisiológico e possivelmente reprodutivo de touros, além de auxiliar na identificação de possíveis biomarcadores para seleção de reprodutores.

Conforme a literatura consultada, a evidencia científica do presente estudo revela que a microbiota intestinal pode afetar o comportamento emocional e funções do sistema cerebral (MAYER et al., 2014). Vários sistemas estão trabalhando para garantir o funcionamento eficiente do eixo microbiota-intestino-cérebro, incluindo os sistemas nervosos central, autônomo e entérico, o sistema imunológico e o sistema endócrino que estão envolvidos na comunicação com a microbiota intestinal (CRYAN et al., 2012). Assim também o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal é responsável por controlar as reações ao estresse, participa na digestão, na sexualidade e armazenamento e gasto energético.

Segundo Mohajeri et al. (2018), a microbiota tem potencial de influenciar a função neuronal, seja direta ou indiretamente utilizando metabolitos microbianos neuroativos como os ácidos graxos de cadeia curta assim como neurotransmissores e vitaminas. Deste modo, a função neuroendócrina do cérebro pode ser afetada pela microbiota intestinal. Assim, variações na microbiota ruminal e intestinal podem influenciar diretamente os metabolitos, os quais são os produtos finais de uma série de reações químicas.

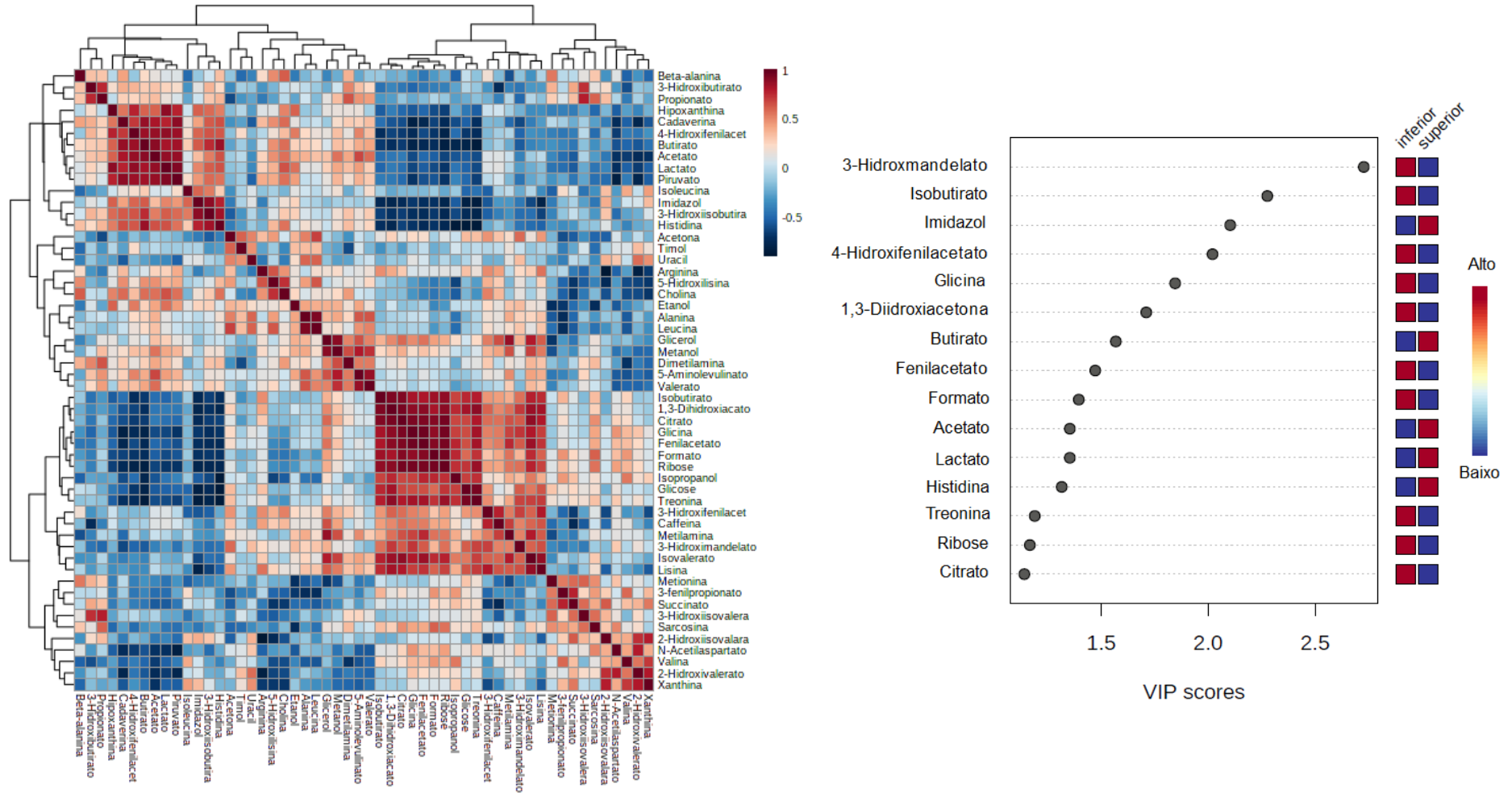


Figura 4. Correlação e VIP score dos metabólitos das fezes de touros Nelore. A) Cada quadrado representa o coeficiente de correlação de Spearman entre os metabólitos, A ordem do metabólito é determinada como no agrupamento hierárquico. As cores e intensidade indicam a força e a direção das relações significativas ($p < 0,05$); as cores azul e vermelha indicam, respectivamente, correlações positivas e negativas. As auto correlações são identificadas em vermelho. B) Metabólitos principais (mudança do espectro químico - ppm) selecionados pelo VIP scores ($VIP > 1,0$).

Com o intuito de compreender melhor a utilidade dos metabólitos detectados pelo método de ^1H RMN, foi realizada uma análise das vias metabólicas, no intuito de associar os metabólitos às suas respectivas vias (Figura 5). As vias metabólicas mais relevantes para diferenciar touros do grupo inferior e superior foram o metabolismo da beta alanina, metabolismo de glicina, serina e treonina, metabolismo do piruvato, metabolismo de glicolipídeos e metabolismo da histidina (Tabela 2).

Neste contexto, a alanina está relacionada com o metabolismo dos aminoácidos. Dado que os aminoácidos desempenham funções-chave em múltiplos processos celulares, influenciam a atividade metabólica (KIM et al., 2021), já os metabólitos como acetato e butirato estão associados a fermentação microbiana (MAO et al., 2012). Outros dos metabólitos encontrados participam das vias do acetil coenzima A e do piruvato e o que indica forte presença na glicólise e no ciclo do ácido tricarboxílico (NELSON & COX, 2018).

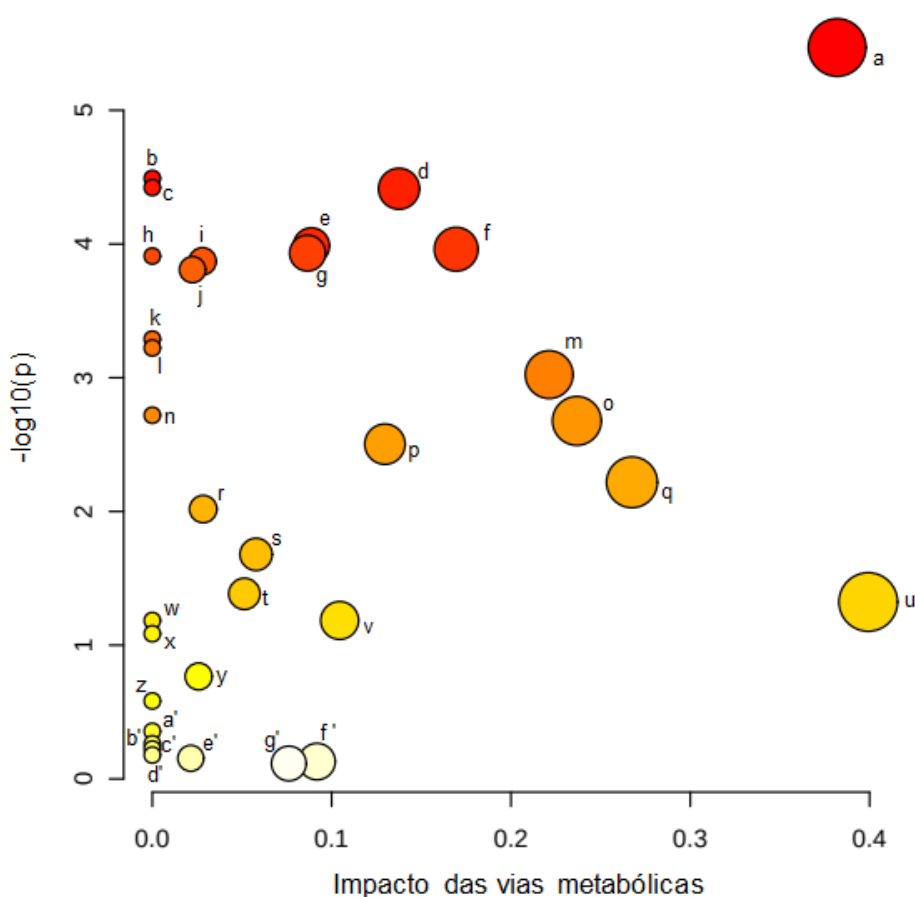


Figura 5. Vias metabólicas associadas à diferenciação entre touros Nelore (*Bos indicus*) inferior e

superior. As letras indicam as vias (ver Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da análise das vias metabólicas das fezes de touros Nelore (*Bos indicus*).

Letra ^a	Via metabólica	Compostos Totais ^b	Hits ^c	p-valor ^d	- log(p) ^e	Impacto ^f
a	Metabolismo da glicina, serina e treonina	34	6	0,001	5,47	0,38
b	Biossíntese de aminoacil-tRNA	48	10	0,001	4,50	0,00
c	Via da pentose fosfato	22	1	0,001	4,42	0,00
d	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	32	5	0,001	4,41	0,14
e	Metabolismo da glutatona	28	2	0,001	4,00	0,09
f	Ciclo de citrato (ciclo TCA)	20	3	0,001	4,00	0,17
g	Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	28	5	0,001	3,93	0,09
h	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	8	4	0,001	3,91	0,00
i	Metabolismo de porfirina e clorofila	30	2	0,001	3,87	0,03
j	Biossíntese primária de ácidos biliares	46	1	0,001	3,80	0,02
k	Metabolismo da fenilalanina	12	1	0,001	3,30	0,00
l	Metabolismo de butanoato	15	3	0,001	3,22	0,00
m	Metabolismo de histidina	16	1	0,001	3,02	0,22
n	Metabolismo de tirosina	42	2	0,001	2,72	0,00
o	Metabolismo de glicerolípídeo	16	2	0,002	2,68	0,24
p	Glicólise / Gluconeogênese	26	5	0,003	2,50	0,13
q	Metabolismo de piruvato	22	3	0,006	2,22	0,27
r	Degradação de valina, leucina e isoleucina	40	4	0,009	2,01	0,03
s	Metabolismo de arginina e prolina	38	2	0,02	1,68	0,06
t	Metabolismo de purina	66	2	0,04	1,38	0,05
u	Metabolismo de beta-alanina	21	3	0,04	1,32	0,40
v	Metabolismo de cisteína e metionina	33	2	0,06	1,18	0,10
w	Metabolismo da biotina	10	1	0,06	1,18	0,00
x	Degradação de lisina	25	2	0,08	1,08	0,00
y	Metabolismo de glicerofosfolípídeo	36	1	0,17	0,77	0,02
z	Síntese e degradação de corpos cetônicos	5	1	0,26	0,58	0,00
a'	Metabolismo da cafeína	12	1	0,44	0,35	0,00
b'	Metabolismo de propanoato	23	3	0,54	0,26	0,00
c'	Metabolismo da galactose	27	1	0,59	0,22	0,00
d'	Metabolismo de selenocomposto	20	1	0,66	0,17	0,00
e'	Biossíntese de pantotenato e CoA	19	3	0,70	0,15	0,021

f'	Metabolismo de pirimidina	38	2	0,74	0,13	0,09
g'	Biossíntese de arginina	14	1	0,76	0,11	0,08

^aLetra corresponde às informações mostradas na Figura 5.

^bCompostos Totais corresponde ao número total de compostos na via metabólica.

^c*Hits* corresponde ao número realmente correspondido dos dados enviados pelo usuário.

^dp-valor foi calculado a partir da análise de enriquecimento.

^e- log(p) corresponde ao logaritmo do p-valor.

^fImpacto corresponde ao valor de impacto do caminho calculado a partir da análise da topologia do caminho.

Conforme Dias e Silva et al. (2019) “os metabólitos desempenham um papel essencial no metabolismo e manutenção do meio interno, na produção, no desenvolvimento e no armazenamento e utilização dos substratos”. Contudo, os resultados apresentados no presente estudo são uma base importante para compreender melhor os mecanismos pelos quais os metabólitos das fezes podem ajudar a selecionar touros reprodutores.

5 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo preliminar demonstram a distinta contribuição dos metabólitos das fezes para os touros superiores e inferiores de acordo com o índice de seleção. Nossos resultados fornecem informações importantes sobre possíveis biomarcadores fecais que podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de seleção em programas de melhoramento. Além disso, estudos adicionais são necessários para verificar e confirmar o comportamento do perfil metabólico das fezes de reprodutores.

6 REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Beef Report 2020**. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>. Acesso em: 18 ago. 2021.
- ABIEC. **Perfil da Pecuária no Brasil Relatório Anual 2016**. Disponível em: <<http://www.assessoriaagropecuaria.com.br/anexo/88>>. Acesso em: 04 sep. 2021.
- ABRAFRIGO. Associação Brasileira de Frigoríficos. **Exportação De Carnes E Derivados De Bovinos – Janeiro A Dezembro/2019**. 2020. Disponível em: https://www.abrafrigo.com.br/wp-content/uploads/2019/12/ABRAFRIGO-Exporta%C3%A7%C3%A3o-Carne-Bovina-Jan_2018-a-Dez_2019.pdf. Acesso em: 03 sep. 2021.
- ABREU, L. R. A. et al. Genetic trends and trade-offs between growth and reproductive traits in a Nellore herd. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, 16 ago. 2018.
- ACGZ. **Associação dos Criadores Gaúchos de Zebu**. Disponível em: http://www.acgz.com.br/secao_racas.php?pagina=1. Acesso em: 31 ago. 2021.
- ALBUQUERQUE, L. G. de; MERCADANTE, M. E. Z.; ELER, J. P. Aspectos da seleção de Bos indicus para produção de carne: revisão bibliográfica. **Boletim de Indústria Animal**. Nova Odessa, v.64, n.4, p.339-348, out./dez., 2007.
- ALCÂNTARA, M.V. **Avaliação Andrológica em Touros de Alto Valor Zootécnico**. 2017. 33p. Monografia (Graduação). Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2017.
- ALENCAR, M.M. Perspectivas para o melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE MELHORAMENTO ANIMAL, REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. CD-ROM
- ALIAKBARI, A.; EHSANI, A.; VAEZ TORSHIZI, R.; LØVENDAHL, P.; ESFANDYARI, H.; JENSEN, J.; SARUP, P. Genetic variance of metabolomic features and their relationship with body weight and body weight gain in Holstein cattle. **Journal of Animal Science**, v. 97; p. 3832-3844, 2019.
- ANDRADE, R.G.; BATISTELLA, M.; VICTORIA, D.C.; BARBOSA, R.A.; PAZ, A.R. **Uso de técnicas de sensoriamento remoto no mapeamento da evapotranspiração de pastagens**. Campinas, SP: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2009. 44p. (Documentos, 75)
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. [s.l.] Brasília, DF: Embrapa, 2019., 2019.
- AZEVÊDO, D.M.M.R.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.N.B. et al. Desempenho reprodutivo de vacas Nelore no Norte e Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**,

v.35, p.988-996, 2006.

BARBOSA, R. T. et al. Características produtivas e reprodutivas de fêmeas da raça Nelore e cruzadas 1/2 Canchim + 1/2 Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p. 960-967, 1999.

BARROS JÚNIOR, Cicero Pereira et al. Melhoramento Genético em Bovinos de Corte (Bos indicus). **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 13, n. 1, p. 4558-4564, 2016.

BOICHARD, Didier et al. Genomic selection in domestic animals: principles, applications and perspectives. **Comptes rendus biologiques**, v. 339, n. 7-8, p. 274-277, 2016.

BOURDON, R. M. Understanding Animal Breeding. **Upper Saddle River: Prendice-Hall**, 2000. 298 -316 p.

BRIDI, A.M.; CONSTANTINO, C. TARSITANO, M.A. Qualidade da Carne de Bovinos Produzidos em Pasto. In: **Simpósio de produção animal à pasto**, 2011, Maringá. Anais... [S.l.:s.n., 2011. p.311-332.

BRUMATTI, R.C.; FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; FORMIGONNI, I.B. Desenvolvimento de índice de seleção em gado de corte sob o enfoque de um modelo bioeconômico. **Arquivos Zootecnia**, 60:205-213, 2011.

CAETANO, T. F. **Mercado de bovinos de corte: assimetria e transmissão de preços entre os principais mercados exportadores de carne bovina**. 2019. 2013. 63p. Dissertação (Agronegócio) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2019.

CARVALHEIRO, R. (2014) Genomic Selection in Nelore Cattle in Brazil. In: **10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**. Presentations... Vancouver.

CÔNSOLO, N. R. B.; FERRARI, V. B.; MESQUITA, L. G.; GOULART, R. S.; SILVA, L. F. P. Zilpaterol hydrochloride improves beef yield, changes palatability traits, and increases calpain-calpastatin gene expression in Nellore heifers. **Meat Science**, v. 121, p. 375–381, 2016.

CORRÊA DA SILVA, M.; MARIA BOAVENTURA, V.; SOARES FIORAVANTI, M. C. HISTÓRIA DO POVOAMENTO BOVINO NO BRASIL CENTRAL. **Revista UFG**, [S.l.], v. 13, n. 13, 2017. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/revistaufg/article/view/48451>. Acesso em: 10 set. 2021.

CRYAN, John F.; DINAN, Timothy G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature reviews neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 701-712, 2012.

CUNNINGHAM, E. P.; TAUEBERT, H. Measuring the effect of change in selection indices. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 6192-6196, 2009.

- DIAS E SILVA; N. C.; MERCADANTE, M. E. Z.; LEITE, R. F.; FAUSTINO, T. F.; REZENDE, A. V. de. Relação entre consumo alimentar residual e perfil metabólico para bovinos de corte. **Arquivo Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v. 22, n. 1, p. 37-42, 2019.
- FERRAZ FILHO, P. B.; RAMOS, A.A.; SILVA, L.O.C. et al. Tendência genética dos efeitos direto e materno sobre os pesos à desmama e pós-desmama de bovinos da raça tabapuã no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.635-640, 2002.
- FGVces. **Pegada de carbono da carne bovina brasileira: análise da cadeia produtiva e aspectos ambientais**. Centro de Estudos em Sustentabilidade da Escola de Administração de Empresas de São Paulo da Fundação Getulio Vargas. São Paulo, p.101. 2018.
- FIESP. **Projeções para o agronegócio brasileiro**. 2020. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/>>. Acesso em: 21 ago. 2021.
- FONTANESI, L. Metabolomics and livestock genomics: Insights into a phenotyping frontier and its applications in animal breeding. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 1, p. 73-79, 2016.
- GODDARD, M. E. and HAYES, B. J. Optimisation of response using molecular data. In: **Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**. 2002. p. 3-10.
- GUIMARÃES, N. C. **Parâmetros genéticos de caracteres quantitativos relacionados à produtividade de rebanhos selecionados da raça nelore**. 2016. p.83. Dissertação (Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2016.
- GOLDANSAZ, S. A.; GUO, A. C.; SAJED, T.; STEELE, M.A.; PLASTOW, G. S.; WISHART, D. S. Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. **PLoS ONE** 12(5), 2017.
- GRESSLER, S. L. BERGAMANN, C.S.P.; PEREIRA, C.S. et al. Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.427-437, 2000.
- HAMORI, D. **Constitutional disorders and hereditary diseases in domestic animals**. New York, Elsevier, 1983. 728p.
- HAZEL, L. N.; LUSH, Jay L. The efficiency of three methods of selection. **Journal of Heredity**, v. 33, n. 11, p. 393-399, 1942.
- HAZEL, L. N. La base genética para la construcción de índices de selección. **Genética**, v. 28, n. 6, p. 476-490, 1943.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PPM 2019: após dois anos de queda, o rebanho bovino cresce 0,4%**. Brasil. 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29163-ppm-2019-apos-dois-anos-de-queda-rebanho-bovino->

cresce-0-4. Acesso em: 01 sep. 2021.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2017**. Brasil. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html>. Acesso em: 15 ago. 2021.

INDIGO. **Inovação no agronegócio: tendências para os próximos anos**. 2021. Disponível em: <<https://www.indigoag.com.br/pt-br/pages/noticias/inovacao-no-agronegocio>>. Acesso em: 03 set. 2021.

INSKEEP, Philip B.; HAMMERSTEDT, Roy H. A calorimetric method to assess endogenous metabolism and its application to the study of bovine sperm. **Journal of Biochemical and Biophysical methods**, v. 7, n. 3, p. 199-210, 1983.

KIM, Hyun Sang et al. Exploration of metabolite profiles in the biofluids of dairy cows by proton nuclear magnetic resonance analysis. **PloS one**, v. 16, n. 1, p. e0246290, 2021.

LACERDA, J. D. **Parâmetros e tendências genéticas para características de crescimento em bovinos da raça Nelore no Estado da Bahia utilizando Inferência Bayesiana**. 2013. 60p. Dissertação (Produção de Ruminantes) - Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2013.

LAMOSO, L. P. Dinâmicas produtivas da economia de exportação no Mato Grosso do Sul-Brasil. **Mercator-Revista de Geografia da UFC**, v. 10, n. 21, p. 33-47, 2011.

LIANG, G.; CHEN, Y.; GUAN, L. L.; KONG, R. S. G.; STOTHARD, P. Transcriptome profiling of the rumen epithelium of beef cattle differing in residual feed intake. **BMC Genomics**, v. 17, p. 592, 2016.

LIMA, Paulo Ricardo Martins. **Parâmetros genéticos para características produtivas, reprodutivas e escores visuais em bovinos da raça nelore**. 2011. 83p. Dissertação (Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

MACEDO, L. O. B. Modernização da pecuária de corte bovina no brasil e a importância de crédito rural. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 7, p. 83-95, 2006.

MALAFIA, G. C.; DIAS, F. R. T.; DE MEDEIROS, S. R. **A pecuária de corte mundial em números**: Centro de Inteligência da Carne Bovina. [s.l.] Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355108/51748908/Boletim+CiCarne+48_02-2021.pdf/53bb8c5d-abb1-76b8-34fc-b81e3ef787f6>. Acesso em: 3 set. 2021.

MALAFIA, G. C.; CONTINI, E.; DIAS, F. R. T.; GOMES, R. da C.; MORAES, A. E. L. de. **Cadeia produtiva da carne bovina: contexto e desafios futuros**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2021. PDF (45 p.): il. Color– (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 291). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224434/1/DOC-291-Final-em-Alta.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2021.

- MALHEIROS, J. M. et al. Comparative untargeted metabolome analysis of ruminal fluid and feces of Nelore steers (*Bos indicus*). **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 12752, 17 jun. 2021.
- MAO, Shengyong et al. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2012.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 01 sep. 2021.
- MARQUES, E. G.; MAGNABOSCO, C. U.; LOPES, F. B. Índices de seleção para bovinos da raça Nelore participantes de provas de ganho em peso em confinamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 669-681, 2012.
- MAYER, Emeran A. et al. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 46, p. 15490-15496, 2014.
- MERCADANTE, M. E. Z. et al. Estudo genético-quantitativo de características de reprodução e produção em fêmeas da raça Nelore. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 155-157, 1996.
- MENEZES, E. B. et al. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2019.
- MIRANDA, D. L. **Avaliação do bem-estar animal na bovinocultura de corte brasileira.** 2011. 136p. Dissertação (Agronegócios) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.
- MOHAJERI, M. Hasan et al. Relationship between the gut microbiome and brain function. **Nutrition reviews**, v. 76, n. 7, p. 481-496, 2018.
- MOREIRA, H.L. **Seleção para características reprodutivas em bovinos de corte da raça Nelore.** 2011. 54p. Dissertação (Produção Animal Sustentável) - Instituto de Zootecnia. Nova Odessa, SP, 2011.
- MOREIRA, H. L. et al. Seleção para características reprodutivas em bovinos de corte da raça Nelore. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 355-362, 2015.
- MPENDA, F. N.; SCHILLING, M. A.; CAMPBELL, Z.; MNGUMI, E. B.; BUZA, J. The genetic diversity of local african chickens: A potential for selection of chickens resistant to viral infections. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, p. 1-12, 2019.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7.** Artmed Editora, 2018.
- PESSOA, Eduardo Rodrigues. **Perfil metabolômico del plasma seminal de touros**

- guzerá (*Bos taurus indicus*) con diferentes parâmetros de congelabilidade do sêmen.** 2021. 59p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Fortaleza, CE, 2021.
- RODRIGUES, M. R. **Parâmetros genéticos e fenotípicos de características de crescimento em bovinos da raça nelore criados no norte do Brasil.** 2020. 61p. Dissertação (Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos) - Universidade Federal de Tocantins, Araguaína, TO, 2020.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. et al. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. **Ecosistemas y recursos agropecuarios**, v. 1, n. 3, p. 295-308, 2014.
- SANTOS, P. M. **Evolução Da Raça Nelore No Brasil.** 2017. 29p. Monografia (Graduação) - Curso de Zootecnia - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2017. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/186/o/Pablo_Maciel_Santos.pdf. Acesso em: 28 jul. 2021.
- SCHULMEISTER, Tessa M. et al. Apparent total tract digestibility, ruminal fermentation, and blood metabolites in beef steers fed green-chopped cool-season forages. **Journal of animal science**, v. 98, n. 6, p. skaa175, 2020.
- SERKOVA, N. J.; DAVIS, D. M.; STEINER, J.; AGARWAL, R. Quantitative NMR-Based Metabolomics on Tissue Biomarkers and Its Translation into In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy. **Methods in Molecular Biology**, v. 1978, p. 369-387, 2019.
- SEYMOUR, W. M.; CAMPBELL, D. R.; JOHNSON, Z. B. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. **Animal feed science and technology**, v. 119, n. 1-2, p. 155-169, 2005.
- SHABAT, S. K. B. et al. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. **The ISME Journal**, v. 10, n. 12, p. 2958–2972, dez. 2016.
- SILVEIRA, Jânio Coelho da et al. Fatores ambientais e parâmetros genéticos para características produtivas e reprodutivas em um rebanho Nelore no estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1432-1444, 2004.
- SISCOMEX. **Sistemas de Comércio Exterior.** Disponível em: <http://siscomex.gov.br/>. Acesso em: 03 sep. 2021.
- SMIRNOV, Kirill S. et al. Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 5, p. 266-279, 2016.
- SOUSA, G.G.T. et al. Características reprodutivas de bovinos da raça Nelore do meio Norte do Brasil. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 21, ed. 208, 2012.
- TANAKA, A. L. R. et al. Bioeconomic selection index for Nellore beef cattle females. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 236, p. 537–548, dez. 2012.

- TEIXEIRA, J. C.; HESPANHOL, A. N. A trajetória da pecuária bovina Brasileira. **Caderno Prudentino de Geografia**, Presidente Prudente, v. 1, n. 36, p. 26–38, jan. 2014.
- TORRES JÚNIOR, JR de S. et al. Technique and economic considerations about assisted reproduction in beef cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 1, p. 53-58, 2009.
- USDA. **Brazil Once Again Becomes the World's Largest Beef Exporter**. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/amber-waves/2019/july/brazil-once-again-becomes-the-world-s-largest-beef-exporter/>>. Acesso em: 01 sep. 2021.
- USDA. **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 05 set. 2021.
- VALERIO, Azzurra et al. Fecal metabolomics as a novel noninvasive method for short-term stress monitoring in beef cattle. **Journal of proteome research**, v. 19, n. 2, p. 845-853, 2020.
- VASCONCELOS, André Belico de. Bioquímica do sêmen. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 32-35, 2009.
- VIANA, A. F. **Avaliação genética de bovinos da raça Nelore em diferentes condições de criação**. 2019. 52 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2019.
- XIA, Jianguo et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_2, p. W652-W660, 2009.
- XIA, Jianguo et al. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics**, v. 9, n. 2, p. 280-299, 2013.
- ZHU, Chenglin et al. Characterization of yak common biofluids metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Metabolites**, v. 9, n. 3, p. 41, 2019.
- ZUIN, R. G. et al. Genetic analysis on growth and carcass traits in Nelore cattle. **Meat Science**, v. 91, n. 3, p. 352–357, 1 jul. 2012.