

Namíbia Aparecida Teixeira

Perfil metabólico no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro  
de acordo com o sexo cromossômico

### Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os diferentes perfis metabólicos do meio de cultivo de embriões bovinos machos e fêmeas, com finalidade de determinação do sexo embrionário de forma não invasiva e com elevada acurácia. Para isto, foram utilizados oócitos oriundos de ovários de abatedouro de genética predominantemente *Bos indicus*, os quais foram fertilizados com quatro touros distintos *Bos indicus*. Do total de embriões produzidos foram selecionados blastocistos de grau 1 de qualidade e foram distribuídos nos seguintes grupos: Machos (embriões machos, n = 79) e Fêmeas (embriões fêmeas, n = 80), além de um grupo em Branco (meio de cultivo sem estrutura, n = 49), para este total foram realizadas 4 repetições biológicas. No dia 4 de seu desenvolvimento, os embriões foram colocados em gotas de cultivo individual onde permaneceram até o dia 7. Neste momento, o sexo do embrião foi determinado pela amplificação do gene TPSY por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), e a análise metabólica untarget foi realizada utilizando-se o meio de cultivo das gotas individuais pela técnica ionização por eletrospray (ESI). O software online MetaboAnalyst 5.0 foi utilizado para análises estatísticas. Para avaliar as diferenças entre embriões machos e fêmeas na expressão de metabólitos, foi realizada uma análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Em uma análise preliminar sem separar pelo estágio de desenvolvimento dos embriões foi possível verificar uma sobreposição de metabolitos. Assim, foi realizado, a análise separada para cada um dos três diferentes estágios de desenvolvimento: blastocistos (BL), blastocistos expandidos (BX) e blastocistos eclodidos (BE). A partir do modelo PLS-DA foram determinadas variáveis de importância na projeção (VIPs) em cada grupo de estudo. O PLS-DA gerou uma lista de 15 íons VIP para cada uma das análises em cada estágio de desenvolvimento. Por fim, para verificar a eficácia do teste de classificação, foi utilizada uma curva de características operacionais do receptor (ROC). A acurácia preditiva foi de 80% para o grupo geral de embriões, 87% para BL, 68% para BX e 79% para BE ( $P < 0,05$ ). Para os três estágios de desenvolvimento, prosseguiu-se com a atribuição dos íons com base em seus valores de massa utilizando o banco de dados HMDB 5.0 (Human Metabolome Database). Para uma maior compreensão foi realizado o estudo de rotas metabólicas utilizando o MetaboAnalyst 5.0. Os resultados indicaram 09 vias

significativamente ( $P < 0.1$ ) ativadas com base nos metabólitos identificados. No grupo de fêmeas, predominaram as rotas da pentose fosfato, fosfato de inositol, efeito Warburg e pirimidina, já no grupo de machos, destacaram-se as rotas da vitamina B6 e aspartato indicando perfis distintos entre os grupos reflexo de suas diferenças fisiológicas, especialmente no metabolismo energético. A análise da curva ROC mostrou boa acurácia para os estágios BL e BE dos embriões, mas a complexidade do painel requer desenvolvimento de um algoritmo para aprimorar a predição, considerando o estágio embrionário. Embriões zebuínos machos e fêmeas mostraram diferenças significativas na produção de metabólitos.

Palavras-chave: Produção *In Vitro* de Embriões, Sexagem, Metabolômica, Bovinos.

### Abstract

The objective of the present study was to evaluate the different metabolic profiles of the culture media of male and female bovine embryos, with the aim of determining embryonic sex non-invasively and with high accuracy. For this, it was used oocytes from slaughterhouse ovaries with predominantly *Bos indicus* genetics, which were fertilized with four different *Bos indicus* bulls. From the total number of embryos produced, quality grade 1 blastocysts were selected and distributed into the following groups: Males (male embryos,  $n = 79$ ) and Females (female embryos,  $n = 80$ ) plus a Blanc group (culture media without structure,  $n = 12$ ), for this total, 4 biological replications were carried out. On day 4 of their development, the embryos were placed in individual culture drops where they remained until day 7. At this point, the sex of the embryo was determined by amplification of the TPSY gene by Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR), and metabolic analysis was performed using the culture media of individual drops using the electrospray ionization technique (ESI) MetaboAnalyst 5.0 online software was used for statistical analyses. To evaluate the differences between male and female embryos in metabolite expression, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed. In a preliminary analysis without separating by the developmental stage of the embryos, it was possible to verify an overlap of metabolites. Therefore, a separate analysis was carried out for each of the three different stages of development: blastocysts (BL), expanded blastocysts (BX) and hatched blastocysts (BE). Using the PLS-DA model, variables of importance in the projection (VIPs) were determined in each study group. PLS-DA generated a list of 15 VIP ions for each of the analyzes at each stage of development. Finally, to verify the effectiveness of the classification test, a receiver operating characteristic (ROC) curve was used. The predictive accuracy was 80% for the

general group of embryos, 87% for BL, 68% for BX and 79% for BE ( $P < 0.05$ ). For the three stages of development, ions were assigned based on their mass values using the HMDB 5.0 (Human Metabolome Database) database. For greater understanding, the study of metabolic routes was carried out using MetaboAnalyst 5.0. The results indicated 09 significantly ( $P < 0.1$ ) activated pathways based on the identified metabolites. In the female group, the pentose phosphate, inositol phosphate, Warburg effect and pyrimidine routes predominated. In the male group, the vitamin B6 and aspartate routes were highlighted, indicating distinct profiles between the groups, reflecting their physiological differences, especially in energy metabolism. The ROC curve analysis showed good accuracy for the BL and BE stages of the embryos, but the complexity of the panel requires the development of an algorithm to improve the prediction, taking in consideration the embryonic stage. Male and female zebu embryos showed significant differences in metabolite production.

**Key Words:** Embryos Production, Sexing, Metabolomics, Bovine.