

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELE MARIA ZANZARIN

Caracterização metabolômica e proteômica de vesículas de membrana
isoladas do líquido ruminal de bovinos de corte

Maringá
2021

DANIELE MARIA ZANZARIN

Caracterização metabolômica e proteômica de vesículas de membrana
isoladas do líquido ruminal de bovinos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau
Coorientador: Prof. Dr. Rodolpho Martin do Prado

Maringá
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

Z34c

Zanzarin, Daniele Maria

Caracterização metabólica e proteômica de vesículas de membrana isoladas do líquido ruminal de bovinos de corte / Daniele Maria Zanzarin. -- Maringá, PR, 2021. 39 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau.

Coorientador: Prof. Dr. Rodolpho Martin do Prado.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2021.

1. Vesículas de membrana. 2. Metabólica. 3. Rúmen. 4. Proteômica. 5. Espectrometria de massas. I. Pilau, Eduardo Jorge, orient. II. Prado, Rodolpho Martin do, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 572

DANIELE MARIA ZANZARIN

Caracterização metabolômica e proteômica de vesículas de membrana
isoladas do líquido ruminal de bovinos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovado em: 25/08/2021

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau
(Presidente)

Prof. Dr. Hilário Cuquetto Mantovani
(UFV)

Prof. Dr. Marco Aurélio Schüler de Oliveira
(UEM)

BIOGRAFIA

Daniele Maria Zanzarin, filha de Maria de Lourdes Petean Zanzarin e Antônio Zanzarin (*in memoriam*), nasceu em Rinópolis, estado de São Paulo, em 12 de dezembro de 1996. Cresceu em Piacatu, estado de São Paulo, onde concluiu o ensino médio na Escola Estadual Professora Cinelzia Lorenci Maroni em 2013.

Em 2015, ingressou na Universidade Estadual de Maringá e iniciou a graduação em Bioquímica. Em 2016, realizou Iniciação Científica no Laboratório de Microrganismos, no Departamento de Bioquímica. Em 2017 e 2018 realizou Iniciação Científica no Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas, no Departamento de Química. Em 2018 defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Endometaboloma e Exometaboloma de *Ruminococcus flavefaciens*” e obteve diploma de Bacharela em Bioquímica, pela Universidade Estadual de Maringá.

Em 2019 iniciou o mestrado em Ciências Biológicas, com área de concentração em Biologia Celular e Molecular, na Universidade Estadual de Maringá, e foi contemplada com bolsa CAPES.

No dia 25 de agosto de 2021, se submeteu à banca de defesa de dissertação e obteve o título de Mestre em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fortaleza, iluminar minhas escolhas e me capacitar para mais essa conquista;

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade proporcionada em desenvolver minha pesquisa;

Ao Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau, pela orientação, confiança no meu trabalho, liderança e amizade ao longo destes anos;

Ao Prof. Dr. Rodolpho Martin do Prado, por todos os ensinamentos, pelos conselhos e incentivos, dedicação e amizade;

A todos do Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (LaBioMass), pela ajuda e parceria durante estes anos;

Ao Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos e à Profa. Dr. Maria Aparecida Fernandez por cederem acesso aos seus laboratórios e contribuírem imensamente para a realização desta pesquisa. Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Março, Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, Prof^ª. Dr^ª. Danielle Lazarin e Rayanne Beltrame pela colaboração em etapas importantes desta pesquisa;

Aos funcionários e alunos responsáveis pela manutenção e cuidado dos animais da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM). Deixo minha simbólica gratidão também aos três bovinos que forneceram a matriz de estudo para minha pesquisa;

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), pela disponibilização de equipamentos essenciais na realização deste trabalho;

À minha família, por acreditar no meu potencial e sempre me incentivar a buscar o conhecimento. Ao meu namorado Jonas, pela compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigada por acreditar em mim e me lembrar disso sempre;

À minha amiga Cler, que também se tornou companheira de trabalho durante o mestrado. Obrigada por caminhar ao meu lado durante esses anos, compartilhar momentos e experiências, pela lealdade, incentivo e parceria.

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

APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido a *mSystems® Journal* (ISSN 2379-50771), da *American Society for Microbiology*. O Qualis desta revista ainda não consta nos dados da Plataforma Sucupira. Modificações foram realizadas para facilitar o entendimento do texto e para obedecer aos critérios estabelecidos pelas resoluções vigentes do Programa.

RESUMO GERAL

A produção de vesículas de membrana é um processo ubíquo em microrganismos. Diversas funções são atribuídas a estas estruturas e por isso constituem um dos campos de pesquisa em ascensão. Entretanto, ainda há uma lacuna sobre a presença e o papel das vesículas em ecossistemas complexos, como o rúmen. Neste estudo, as vesículas de membrana foram isoladas do rúmen pela primeira vez em três bovinos de corte. A microscopia eletrônica de transmissão revelou uma diversidade de tamanhos e formatos das vesículas. A aplicação de abordagens analíticas usando espectrometria de massa combinada com análise quimiométrica e plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* demonstrou que metabólitos e proteínas são enriquecidos ao conteúdo das vesículas isoladas do líquido ruminal. A análise quimiométrica revelou a diferença no perfil metabólico das vesículas em comparação à sua matriz original. A metabolômica demonstrou a presença de compostos bioativos nas vesículas, envolvidos no metabolismo de lipídeos, degradação de material vegetal e sinalização celular. Proteínas envolvidas no transporte mediado por vesículas, tradução e metabolismo de lipídeos também foram identificadas através da proteômica. Juntos, estes resultados revelam fortes indícios de que as vesículas são secretadas pelos microrganismos e que estão envolvidas em importantes processos biológicos dentro do ambiente ruminal.

PALAVRAS-CHAVE: vesículas de membrana, rúmen, espectrometria de massas, GNPS, metabolômica, proteômica

ABSTRACT

Membrane vesicles production is a ubiquitous process in microorganisms. Several functions are assigned to these structures and for this reason they constitute one of the emerging fields of research. However, there is a gap about the presence and role of vesicles in complex ecosystems such as the rumen. In this study, membrane vesicles were isolated from the rumen for the first time, in three beef cattle. Transmission electron microscopy revealed a variety of vesicle sizes and shapes. Analytical approaches using mass spectrometry combined with chemometric analysis and Global Natural Products Social Molecular Networking platform demonstrated that metabolites and proteins are enriched to the content of vesicles isolated from rumen fluid. Chemometric analysis revealed the difference in the metabolic profile of the vesicles compared to their original matrix. Metabolomics demonstrated the presence of bioactive compounds in vesicles, involved in lipid metabolism, degradation of plant material and cell signaling. Proteins involved in vesicle-mediated transport, translation and lipid metabolism have also been identified through proteomics. Together, these results reveal strong evidence that vesicles are secreted by microorganisms and are involved in important biological processes within the rumen environment.

KEYWORDS: membrane vesicles, rumen, mass spectrometry, GNPS, metabolomics, proteomics.

INTRODUÇÃO

O rúmen abriga um rico ecossistema composto por bactérias, arqueas, protozoários, fungos e bacteriófagos, que atuam de forma simbiótica com o hospedeiro (1 - 3). O hospedeiro fornece um ambiente com condições para a fermentação contínua do material vegetal e para estabilidade de sistemas enzimáticos microbianos. Os microrganismos, por sua vez, degradam o material vegetal e fornecem uma ampla variedade de metabólitos que são responsáveis por cerca de 70% da energia metabólica do hospedeiro (4, 5). A maior porção do microbioma ruminal existe na forma de biofilmes (6 - 8), e tem as vesículas de membrana derivada dos microrganismos como importante componente para formação e manutenção de sua estabilidade (9, 10).

As vesículas de membrana são um fenômeno fisiológico ubíquo nos microrganismos (11) e apresentam diâmetro variável entre 15 a 250 nm (12, 13). Evidências apoiam o conceito de que a biogênese de vesículas é um processo regulado e controlado, e está atrelada às condições ambientais e de crescimento do organismo (14, 15). Com isso, as vesículas liberadas por cada microrganismo apresentam composições específicas de lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes periplasmáticos, que afetam diretamente no destino e funções das vesículas, destacando a importância deste mecanismo de seletividade do conteúdo (10, 16, 17).

Diferentes funções são atribuídas às vesículas de membrana de microrganismos, que desempenham papel fundamental na patogênese, sistema de defesa e resistência a antibióticos, formação e estabilização de biofilmes, sinalização celular, transporte de material genético, predação, degradação de substrato e aquisição de recursos (18 - 23). Ainda, biomoléculas e metabólitos podem ser enriquecidos às vesículas, sugerindo a existência de um mecanismo de secreção e entrega que pode disseminar produtos microbianos à distância que permite interação com o ambiente (24).

Embora o estudo de vesículas de membrana esteja em ascensão, o direcionamento maior está na investigação de seu envolvimento em processos patológicos, como doenças autoimunes e câncer, bem como suas possíveis aplicações biomédicas, seja na formulação de vacinas ou como veículo de distribuição de drogas (25 - 28). Entretanto, ainda há uma lacuna sobre a presença e papel destas estruturas em ecossistemas complexos, como o rúmen, uma vez que grande parte dos estudos presentes na literatura envolvem microrganismos isolados.

Foi descrito que a bactéria ruminal *Fibrobacter succinogenes* é produtora de vesículas de membrana que apresentaram altas concentrações de glicosil-hidrolases, contribuindo para a degradação eficiente do material vegetal (29). Porém, apesar da ampla diversidade de microrganismos ruminais, apenas uma pequena porção deles é cultivável e muitos ainda permanecem desconhecidos, o que torna a área pouco explorada (30, 31). Dessa forma, isolar e caracterizar as vesículas de membrana isoladas diretamente do líquido ruminal surge como passo inicial para verificar se essas estruturas estão presentes no ambiente ruminal.

O rápido avanço das tecnologias ômicas traz uma nova perspectiva sobre o estudo de vesículas de membrana. A metabolômica não-direcionada e proteômica são abordagens analíticas amplamente utilizadas para a identificação de metabólitos e proteínas, respectivamente, de uma determinada matriz. Ambas abordagens são baseadas na análise por cromatografia acoplada à espectrometria de massas em *tandem*, o que confere sensibilidade, seletividade e alta reprodutibilidade (32). Os dados gerados pelas análises são avaliados com auxílio de estratégias quimiométricas como a análise de componentes principais, e também através de ferramentas de bioinformática e softwares que avaliam a semelhança de fragmentação de moléculas e/ou peptídeos e os compara com bancos de dados disponíveis (33, 34). Assim, tais abordagens são passíveis de serem empregadas como estratégia para elucidar o perfil do metaboloma e proteoma das vesículas de membrana isoladas do líquido ruminal. As informações fornecidas podem auxiliar na compreensão da atuação das vesículas dentro do metabolismo ruminal, seja em mecanismos de degradação do material vegetal ou interação entre a microbiota, levando à prospecção de proteínas e metabólitos relacionados.

Neste trabalho, foi realizado o primeiro protocolo de isolamento de vesículas de membrana a partir do líquido ruminal de bovinos de corte. A metabolômica não-direcionada foi empregada para explorar o perfil metabólico das vesículas de membrana isoladas do microbioma ruminal. A partir disso, foram avaliadas as diferenças em metabólitos das vesículas quando comparadas com a sua matriz de origem. Metabólitos diferenciais foram putativamente identificados e atribuídos às suas classes químicas através de ferramentas da plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking*. Finalmente, foi utilizado estudo de proteômica nas vesículas para investigar a presença de proteínas e relacioná-las a processos biológicos.

RESULTADOS

Caracterização morfológica das vesículas de membrana isoladas

O protocolo de isolamento foi baseado na remoção gradativa de partículas do alimento dos animais, da sedimentação da microbiota, e outros. Uma vez que o rúmen abriga uma vasta população microbiana, as centrifugações e filtrações garantiram que a amostra final de vesículas de membranas estivesse livre da presença de microrganismos. Isso foi comprovado através da microscopia eletrônica de transmissão e *negative staining*, validando assim o protocolo de isolamento proposto neste estudo. A microscopia também forneceu uma visão das estruturas destas vesículas de membrana isoladas (Figura 1).

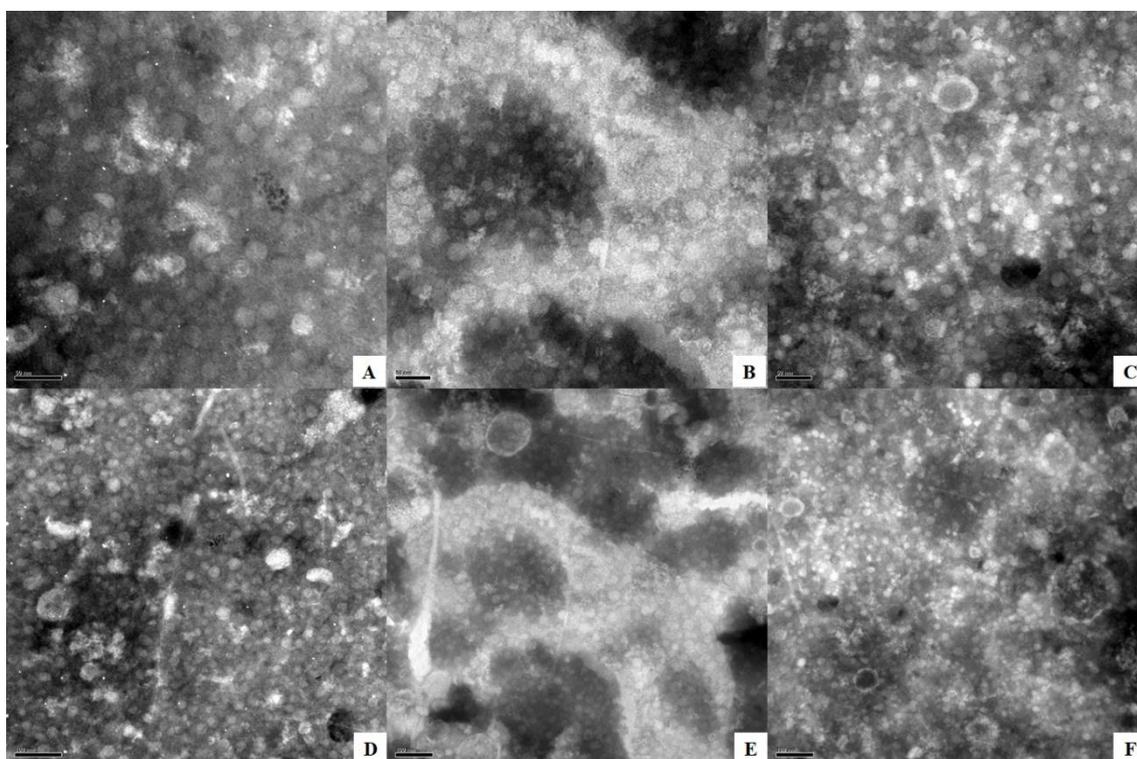


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão e *negative staining* de amostras de vesículas de membrana isoladas do líquido ruminal de bovinos de corte. As imagens A, B e C estão representadas em escala de 50 nm. As imagens D, E e F estão representadas em escala de 100 nm. Em A e D, vesículas isoladas do bovino 1; em B e E, vesículas isoladas do bovino 2; em C e F, vesículas isoladas do bovino 3).

As amostras dos três bovinos apresentaram uma grande concentração de vesículas de membrana, que exibem diversidade de tamanhos e formatos. Em sua maioria, o

diâmetro demonstra ser próximo de 50 nm (Figura 1, A, B e C), entretanto, é possível observar vesículas de diâmetro maior, em torno de 100 nm (Figura 1, D, E e F).

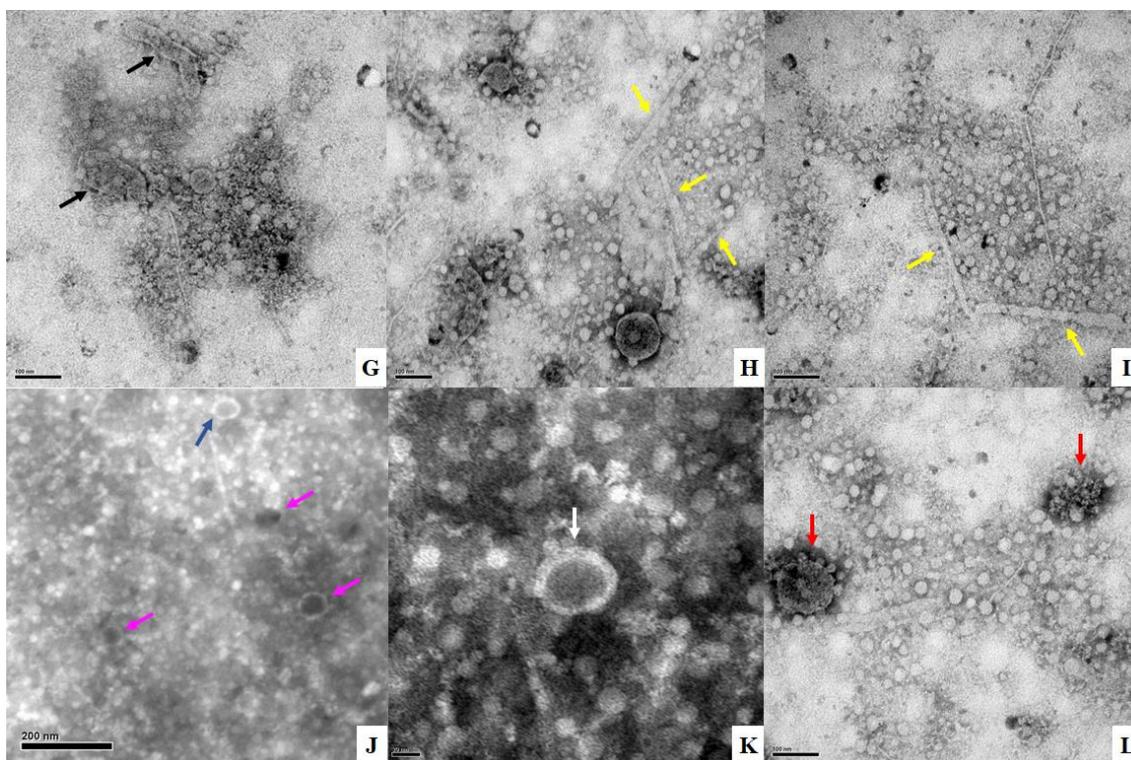


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão e *negative staining* de amostras de vesículas de membrana isoladas do líquido ruminal de bovinos de corte. Na imagem G, as setas pretas indicam vesículas que apresentam formato alongado. Nas imagens H e I, as setas amarelas indicam o tipo especializado de vesículas que exibem formato semelhante a tubos. A barra representa a escala de 100 nm. Na imagem J, as setas rosas indicam vesículas mais densas, enquanto a seta azul indica uma vesícula aparentemente menos densa. Na imagem K, a seta em branco indica uma vesícula que aparenta ter uma membrana em excesso aparentando formar um halo ao redor do núcleo denso da vesícula. Na imagem L, as setas vermelhas indicam dois agregados de vesículas de membrana.

Embora haja predominância do formato esférico, foram observadas algumas vesículas de membrana com formato alongado e elíptico (Figura 2, imagem G), enquanto outras apresentaram um tipo especializado que se assemelha a tubos (Figura 2, imagem H e I). Algumas vesículas aparentam possuir um núcleo mais denso do que em comparação às demais (Figura 2, imagem J), evidenciado pela coloração mais escura. Isso pode ser reflexo dos diferentes tipos de conteúdo enriquecidos a elas. Ainda, foi observada a presença de vesículas que exibem um excesso de membrana, dando aparência

de um halo ao redor do núcleo denso (Figura 2, imagem K). Outro fenômeno morfológico detectado na microscopia foram os agregados de vesículas (Figura 2, imagem L). Todas essas características únicas demonstram que o rúmen abriga uma rica diversidade de vesículas de membrana, em formatos, tamanhos e peculiaridades.

Análise por UHPLC/ESI(+)-MS/MS

A técnica UHPLC-ESI(+)-MS/MS foi empregada para avaliar o perfil metabólico das amostras de líquido ruminal bruto, pellet microbiano, sobrenadante livre de células e vesículas de membrana. A extração dos metabólitos de cada amostra foi realizada em duplicata e os cromatogramas da análise foram obtidos em triplicata, totalizando 72 cromatogramas. Os cromatogramas de íons totais (MS) indicaram diferenças nos perfis metabólicos entre os grupos de amostras. No entanto, apenas a inspeção visual destes cromatogramas não é suficiente para discriminar as diferenças metabólicas de cada grupo. Por este motivo, a análise quimiométrica foi utilizada nos dados de UHPLC-ESI(+)-MS/MS.

Análise de componentes principais (PCA)

As matrizes de dados dos três animais foram analisadas por PCA, um método não supervisionado empregado para determinar padrões entre amostras multivariadas. Amostras com alta correlação se agrupam e a diferença entre pontos quaisquer representando amostras é uma aproximação da sua similaridade em relação às variáveis.

A análise de PCA mostrou uma tendência clara de separação entre o conjunto de dados das amostras de líquido ruminal bruto, sobrenadante livre de células, *pellet* microbiano e vesículas de membrana (Figura 3), refletindo as características metabólicas diferenciais entre estes grupos. Os gráficos também revelam que as amostras de vesículas de membrana estão mais distantes das amostras do *pellet* microbiano do que em comparação com as demais. Isso pode ser indício de que mesmo sendo estruturas derivadas dos próprios microrganismos ruminais, as vesículas apresentam íon diferentes que influenciaram nesta separação. Os íons da amostra do branco não se assemelharam a nenhuma das demais, o que valida as análises por mostrar que os íons produzidos são sinais provenientes das amostras. Ainda, no gráfico do bovino 1 é notável que algumas

réplicas do controle de qualidade apareceram fora do limite de 95% de confiança, o que pode ter sido causado por erro analítico, uma vez que as demais amostras aparecem agrupadas.

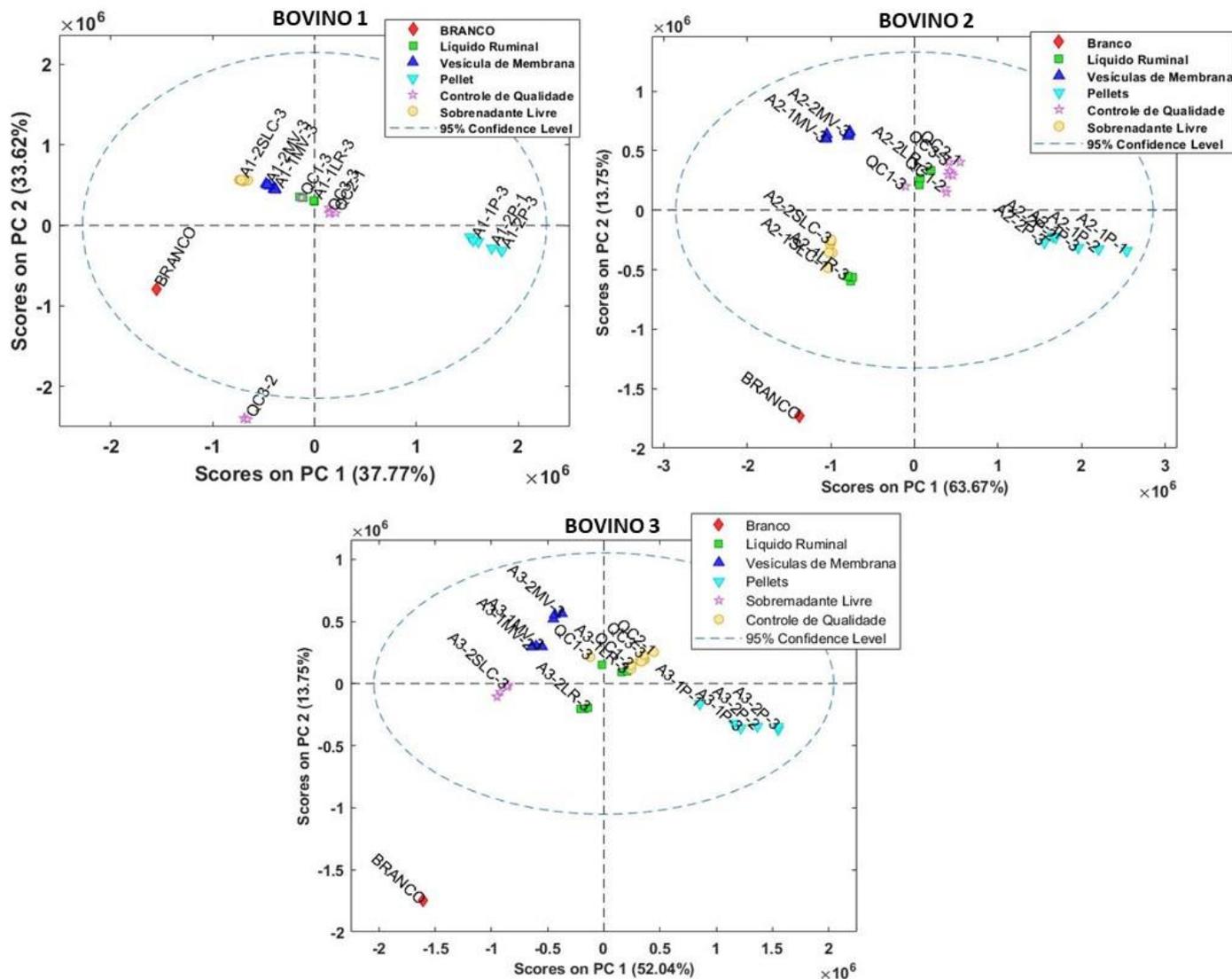


Figura 3. Análise quimiométrica não supervisionada com dados de UHPLC-ESI(+)-MS/MS. Pontuações de PCA para as amostras dos bovinos 1, 2 e 3. Legenda de cada amostra conforme o indicado na figura.

No PCA do bovino 1, o primeiro componente principal (PC1) explicou 37,77 % da variabilidade total do conjunto de dados, enquanto o segundo componente principal (PC2) explicou 33,62 % da variabilidade total do conjunto de dados. No bovino 2, PC1 explicou 63,67 % da variabilidade total do conjunto de dados, enquanto PC2 explicou 13,75 %. Já no bovino 3, PC1 explicou 52,04 % da variabilidade total do conjunto de dados enquanto PC2 explicou 13,75 %. A análise de PCA foi reprodutiva para cada grupo

de amostra, uma vez que as replicatas encontram-se agrupadas. Observa-se também que embora os dados de cada um dos gráficos de PCA sejam referentes a três animais distintos, a distribuição das amostras nos quadrantes apresenta semelhanças, indicando que a reprodutibilidade também ocorreu entre os animais, o que consolida os dados obtidos neste estudo.

Classificação química e identificação de metabólitos

Para a metabolômica não-direcionada, os dados de análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS foram importados na plataforma do GNPS para gerar um mapa químico pela ferramenta Molecular Network (MN). O mapa químico apresenta a correlação dos espectros de fragmentação (MS/MS) de acordo com a similaridade no padrão de fragmentação do íon precursor. Espectros de um mesmo composto são agrupados em um espectro consenso, representado por um nó. Compostos distintos, mas que apresentam similaridade de fragmentação, são agrupados em clusters. Ainda, compostos relacionados com dados presentes em bibliotecas espectrais são destacados, o que auxilia na comparação dos espectros de MS/MS e possibilita a identificação putativa de outros compostos. O fluxo de trabalho *MolNetEnhancer* incorporado ao MN gerado forneceu importantes informações sobre as estruturas químicas presentes em cada família molecular.

Uma vez que os compostos detectados nos grupos de amostra dos três bovinos foram combinados, um total de 638 espectros MS/MS consenso (entidades químicas) foram obtidos no mapa químico (Figura 4). Deste total, 31 entidades químicas foram encontradas exclusivamente em amostras do sobrenadante livre de células, 9 entidades foram detectadas nas amostras de líquido ruminal bruto, 46 entidades detectadas exclusivamente nas amostras de vesículas de membrana e 172 entidades exclusivas das amostras de pellet microbiano. As demais 380 entidades foram detectadas em comum em mais de um grupo de amostra. Essa notável diferença no número de metabólitos individuais de cada grupo de amostra revela perfis metabólicos distintos ainda que dentro de um mesmo sistema biológico - o rúmen - consolidando o resultado demonstrado pelo PCA (Figura 3). Ao mesmo tempo, isso evidencia a ampla integração de vias metabólicas da microbiota ruminal, uma vez que mais de 59,5% das entidades químicas foram compartilhadas por mais de um grupo de amostra.

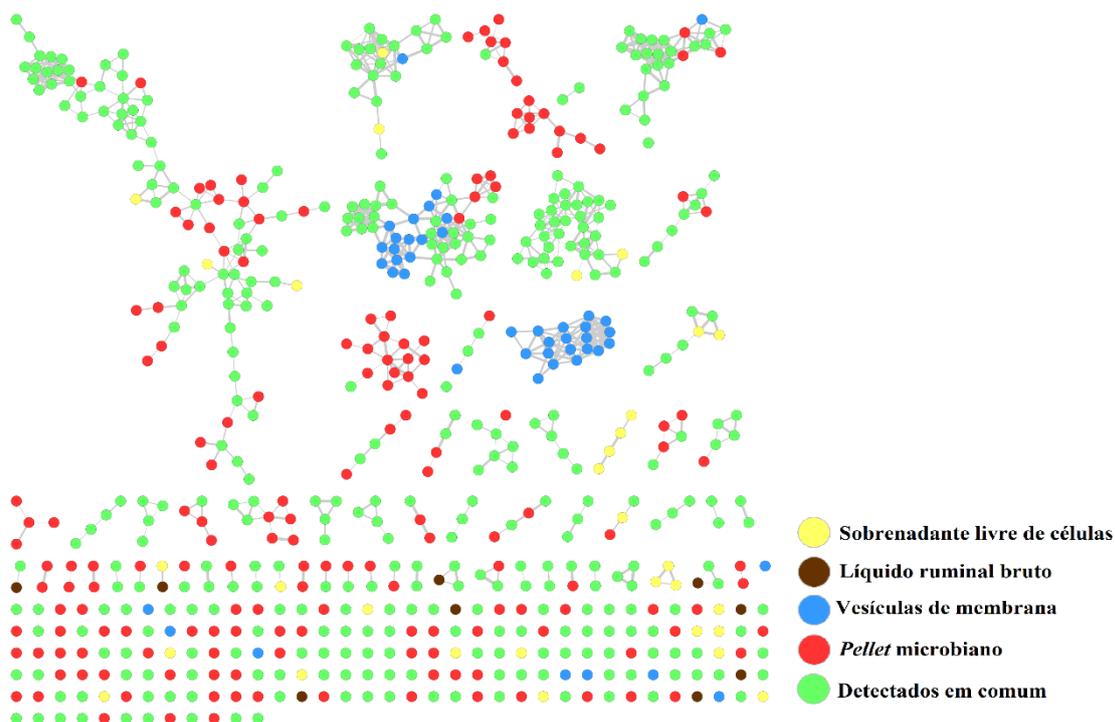


Figura 4. Mapa químico dos espectros MS/MS obtidos pela análise das amostras de líquido ruminal bruto, *pellet* microbiano, sobrenadante livre de células e vesículas de membrana, colorido conforme indicado na legenda anotada no mapa químico.

Através do fluxo de trabalho *MolNetEnhancer*, os compostos presentes no MN foram atribuídos às classes químicas de lipídeos e moléculas relacionadas, ácidos carboxílicos e derivados, compostos orgânicos oxigenados, compostos orgânicos nitrogenados e outros (Figura 5). A partir de todas estas informações, 41 metabólitos foram identificados putativamente (Tabela 1), considerando o erro de massa inferior a 5 ppm. Fórmulas moleculares também foram atribuídas para alguns compostos individuais, assim como a classificação química correspondente.

A Figura 5 evidencia a predominância da classe de lipídeos e derivados na análise, que corresponde a 55,65% de todas as entidades químicas (em laranja). Esse resultado está atrelado tanto à escolha do solvente extrator, que tem influência direta na polaridade dos compostos extraídos, como também pelo metabolismo de lipídeos estar mais ativo após a alimentação dos animais, momento em que foi realizada a amostragem do líquido ruminal. Como mostrado na Tabela 1, os quatro grupos de amostras apresentaram compostos atribuídos aos lipídeos e moléculas relacionadas, seja como metabólito compartilhado ou exclusivo. No entanto, a exclusividade destes metabólitos lipídicos é

maior nos grupos do *pellet* microbiano e vesículas de membrana. Quando destacamos os compostos exclusivos das vesículas (Figura 5, em destaque), 38 deles correspondem somente à essa classe. Considerando o papel que os lipídeos exercem como compostos microbianos, eles podem estar vinculados tanto à estrutura de membrana das vesículas como também fazer parte do conteúdo enriquecido a elas.

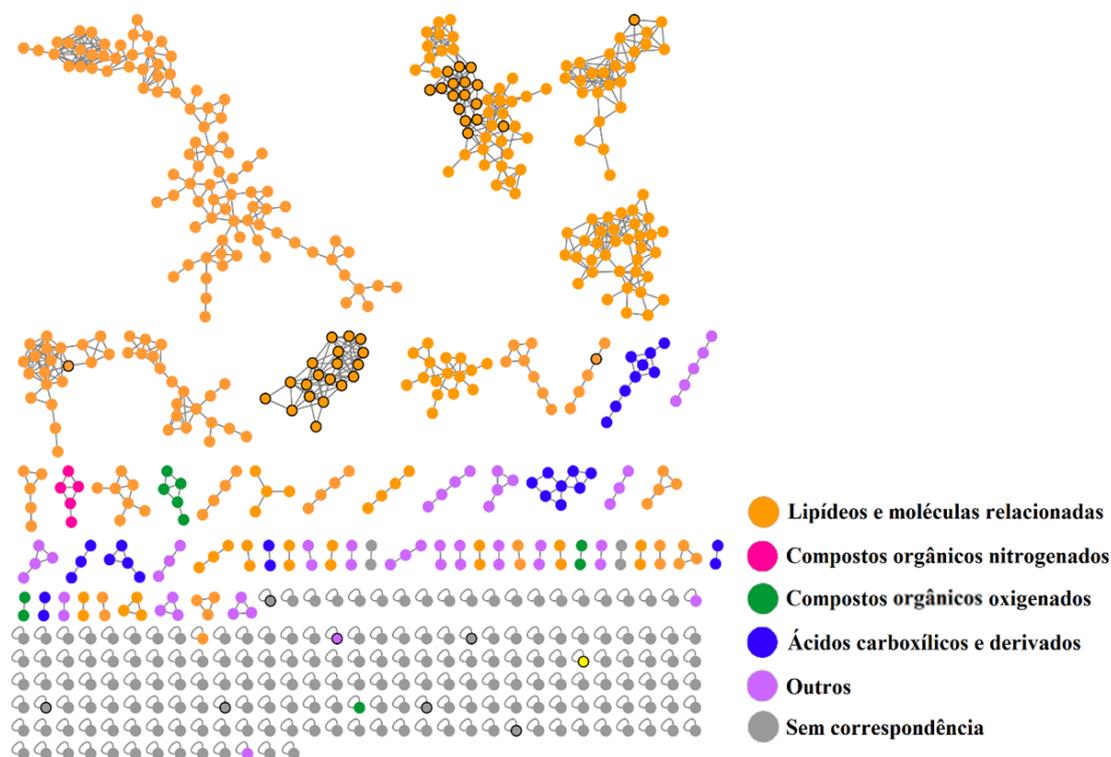


Figura 5. Mapa químico dos espectros MS/MS obtidos pela análise das amostras de líquido ruminal bruto, *pellet* microbiano, sobrenadante livre de células e vesículas de membrana, colorido por classes químicas conforme indicado na legenda anotada no mapa químico. As bordas pretas destacam as entidades químicas exclusivas de vesículas de membrana.

Analisando os componentes da classe de lipídeos, os íons $[M + H]^+ m/z$ 263.2363 e $[M + H]^+ m/z$ 295.2264 foram atribuídos ao ácido linoleico conjugado (CLA) e ácido 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienóico, respectivamente. Dois compostos importantes no metabolismo de lipídeos no rúmen. Já o íon $[M + H]^+ m/z$ 299.1273 corresponde à enterolactona, composto derivado da conversão de lignanas pela microbiota de mamíferos, enquanto o íon $[M + H]^+ m/z$ 180.1018 corresponde à N-acetiltiramina, composto relatado pela primeira vez no rúmen mas que exibe função já descrita em comunidades de microrganismos.

Tabela 1. Identificação putativa de metabólitos a partir da análise de metabolômica não-direcionada.

Identificação Putativa de Metabólitos	Fórmula Molecular	[M + H]⁺ Experimental	[M + H]⁺ Teórica	Erro de Massa (ppm)	Amostras Observadas*
Ácidos Carboxílicos e derivados					
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₃ NO	280.2625	280.2635	-3.54	P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	298.2735	298.2741	-1.86	P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	302.3052	302.3054	-0.52	VM; P
Composto Desconhecido	C ₂₀ H ₄₁ NO ₂	328.3202	328.3210	-2.46	P
Compostos Orgânicos Nitrogenados					
Composto Desconhecido	C ₁₂ H ₂₅ NO	200.2009	200.2009	0.04	SLC; LR; VM; P
Palmitamida	C ₁₆ H ₃₃ NO	256.2629	256.2635	-2.31	SLC; LR; VM; P
Octadecanamida	C ₁₈ H ₃₇ NO	284.2941	284.2948	-2.43	SLC; VM
Compostos Orgânicos Oxigenados					
Enterolactona	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	299.1273	299.1278	-1.62	LR; VM; P
6-[3-[(3,4-dimethoxyphenil)methyl]-4-metoxi-2-(methoximetil)butil]-4-metoxi-1,3-benzodioxole	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	415.2106	415.2115	-2.20	SLC; LR; VM; P
Composto desconhecido	C ₂₄ H ₃₃ NO ₆	432.2373	432.2381	-1.77	SLC; LR; VM; P

Tabela 1. Continuação

Identificação Putativa de Metabólitos	Fórmula Molecular	[M + H] ⁺ Experimental	[M + H] ⁺ Teórica	Erro de Massa (ppm)	Amostras Observadas*
Lipídeos e moléculas relacionadas					
Composto Desconhecido	C ₁₀ H ₂₄ N ₁₂ O ₂	345.2223	345.2218	1.47	SLC; LR; VM
Composto Desconhecido	C ₁₆ H ₂₃ N ₁₁ O ₂	402.2101	402.2109	-1.98	LR; VM
Composto Desconhecido	C ₁₇ H ₃₅ NO ₃	302.2689	302.2690	-0.23	VM
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.2309	279.2319	-3.43	LR; VM; P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	295.2265	295.2268	-0.92	SLC; LR; VM; P
Ácido 13S-Hidroxi-9Z,11E,15Z-octadecatrienoico	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	277.2149	277.2162	-4.71	LR; P
Ácido 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoico	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	295.2264	295.2268	-1.26	P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281.2469	281.2475	-2.16	SLC; LR; VM; P
Ácido Linoleico Conjugado	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	263.2363	263.2369	-2.44	SLC; LR; VM; P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	297.2422	297.2424	-0.74	SLC; LR; VM; P
Ácido 12(13)-Epoxi-9Z-octadecenoico	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	297.2419	297.2424	-1.75	SLC; LR; VM; P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₃ N ₇ O ₆	444.2571	444.2565	1.33	LR; VM; P
Ácido Octadecenoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.2625	283.2632	-2.32	SLC; LR; VM; P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	299.2576	299.2581	-1.57	SLC; LR; VM; P
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2782	285.2788	-2.13	RL; MV; P
Composto desconhecido	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	300.2897	300.2897	-0.02	SLC

Tabela 1. Continuação

Identificação Putativa de Metabólitos	Fórmula Molecular	[M + H]⁺ Experimental	[M + H]⁺ Teórica	Erro de Massa (ppm)	Amostras Observadas*
Composto desconhecido	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	300.2884	300.2897	-4.35	VM
Composto Desconhecido	C ₁₈ H ₃₉ N ₃ O ₆	394.2915	394.2912	0.86	VM
2,3-dihidroxipropil-hexadecanoato	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	331.2837	331.2843	-1.77	SLC; LR; VM; P
N-Oleoil-Etanolamina	C ₂₀ H ₃₉ NO ₂	326.3040	326.3054	-4.16	P
N-Oleoil-Leucina	C ₂₄ H ₄₅ NO ₃	396.3461	396.3472	-2.83	P
N-Oleoil-Phenilalanina	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	430.3302	430.3316	-3.19	P
Composto Desconhecido	C ₂₀ H ₄₀ N ₆ O ₄	429.3177	429.3184	-1.58	LR; VM
Outros					
N-acetiltiramina	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180.1018	180.1019	-0.58	SLC; LR; VM; P
Composto Desconhecido	C ₁₂ H ₁₀ N ₆	239.1049	239.1040	3.89	VM
Composto Desconhecido	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	208.133	208.1332	-0.99	SLC; LR; VM; P
Composto Desconhecido	C ₁₃ H ₁₉ NO ₂	222.1485	222.1489	-1.60	SLC; LR; P
Composto Desconhecido	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	305.0759	305.0768	-2.99	VM
Composto Desconhecido	C ₁₄ H ₂₉ NO ₂	244.2268	244.2271	-1.25	VM
Composto Desconhecido	C ₁₆ H ₃₂ N ₆ O ₄	373.2551	373.2558	-1.82	VM
Composto Desconhecido	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593.2756	593.2758	-0.42	VM

*SLC: sobrenadante livre de células; LR: líquido ruminal bruto; VM: vesículas de membrana; P: *pellet* microbiano.

Análises de proteínas por espectrometria de massas

O método *bottom up*, também denominado *shotgun*, foi utilizado para análise de proteínas das amostras de vesículas de membrana. Este método inclui a separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após a digestão trípica das soluções proteicas, seguida por análise por espectrometria de massa (MS^e). A avaliação dos dados foi realizada aferindo o valor do score e de cobertura da análise, fornecidos pelo software ProteinLynx. As proteínas identificadas são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Proteínas identificadas em vesículas de membrana usando a abordagem *bottom up* e LC-MS^e

Identificação Uniprot	Proteína	Cobertura (%)	Score	Processo Biológico
G0VQ27	Proteína contendo domínio de Hidrolase 4	41.4	430.4469	Não relatado
A0A017H5I7	Proteína ribossômica 50S L7 / L12	28.9	611.6105	Tradução
A5DC90	Lipase putativa ATG15	26.5	226.6546	Autofagia, Degradação de lipídeos, Metabolismo de lipídeo
A0A4V2EQH9	Cadeia leve de Clatrina	20.8	343.5609	Transporte intracelular de proteínas, transporte mediado por vesículas

A análise demonstrou que as vesículas de membrana isoladas do rúmen são enriquecidas com proteínas envolvidas em diferentes processos biológicos (Tabela 2). A proteína ribossômica 50S L7 / L12, relatada em bactérias, tem função no processo de tradução; a lipase putativa Atg15, proteína transmembrana relatada em leveduras, tem envolvimento nos processos de autofagia, degradação e metabolismo de lipídeos; a cadeia leve de clatrina, uma das proteínas que compõem a estrutura poliédrica da clatrina, que está envolvida no transporte mediado por vesículas. A proteína contendo o domínio de Hidrolase 4 também foi identificada neste estudo com as vesículas de membrana e embora ainda não tenha uma atribuição conhecida a um processo biológico específico, foi predita no proteoma da bactéria ruminal *Megasphaera elsdenii* (DSM 20460). Estes resultados da análise proteômica sugerem que o conteúdo de proteínas das vesículas isoladas do rúmen se sobrepõe amplamente aos proteomas de microrganismos existentes,

uma vez que as proteínas encontradas nesta análise são compartilhadas com proteínas já relatadas em diferentes espécies.

DISCUSSÃO

Evidências sugerem a influência do meio na qualidade e quantidade de vesículas (14, 43). Dessa forma, a amostragem de líquido ruminal foi realizada em três bovinos para avaliar a heterogeneidade do conteúdo das vesículas de membrana, e no período de 2 horas após a alimentação dos animais, onde a atividade microbiana ruminal se encontra elevada. As análises de microscopia eletrônica de transmissão revelaram a rica diversidade de vesículas de membrana isoladas do rúmen (Figura 1 e Figura 2). As vesículas são estruturas adaptáveis que exibem variedade de tamanhos e formatos. Isso pode ser reflexo principalmente dos microrganismos dos quais são derivadas e da rota de formação da vesícula (44). Os resultados mostram que as vesículas isoladas do rúmen variam de 50 nm a 100 nm e são consistentes com o que já foi relatado de vesículas derivadas de Gram-positivos, Gram-negativos, fungos, arqueas (12, 13). Além disso, o formato alongado e elíptico (Figura 2, imagem G) em vesículas foi relatado na espécie bacteriana *Acinetobacter baylyi* (43), assim como estruturas em formato de tubos (Figura 2, imagem H e I) foram observados na bactéria *Myxococcus xanthus* (45). Estas estruturas são consideradas tipos especializados de vesículas e possivelmente atuam conectando células dentro de um biofilme, contribuindo no tráfego molecular (44 - 46). Considerando que a maior porção do microbioma ruminal existe na forma de biofilmes, estas estruturas podem desempenhar papel importante na comunicação e troca de componentes entre os microrganismos ruminais. Outra estrutura observada foram os agregados de vesículas (Figura 2, imagem L). Esse fenômeno já foi relatado e pode estar relacionado com características da superfície da membrana externa envolvidas na adesão de células, como também por ação de biomoléculas presentes em biofilmes que causam essa agregação de vesículas (47).

A metabolômica de vesículas de membrana ainda é um campo nascente, mas com grande potencial. Neste estudo, a combinação da técnica UHPLC-ESI(+)-MS/MS associada às ferramentas quimiométricas e MN forneceu importantes informações sobre o perfil metabólico das vesículas de membranas. Os metabólitos foram atribuídos a diferentes classes químicas de acordo com sua estrutura química, o que ajuda

a presumir o destino dos metabólitos, uma vez que fazem parte de reações bioquímicas importantes dentro de um sistema biológico (48). Ainda, analisar o perfil metabolômico das vesículas em comparação com as demais amostras da mesma matriz de origem foi fundamental para constatar as possíveis sobreposições de metabólitos que ocorrem em sistemas biológicos como o rúmen, mas principalmente para evidenciar que certas classes de metabólitos são enriquecidas exclusivamente às vesículas. A Figura 4 ilustra a ampla integração das redes metabólicas dentro do rúmen, uma vez que 59,5 % das entidades químicas foram compartilhadas entre os grupos de amostra. Entretanto, analisando exclusivamente as vesículas (nós em azul), observamos que elas apresentam um perfil distinto das demais. Isso mostra que as vesículas de membranas são metabolicamente ativas e sugere um recrutamento efetivo de metabólitos para as mesmas. A nível de classe, a Figura 5 evidencia a predominância da classe de lipídeos e moléculas relacionadas como um todo na análise, mas principalmente nas vesículas de membrana, já que 38 de seus metabólitos exclusivos são atribuídos a essa classe (Figura 5, em destaque). Esse resultado pode ser sustentado principalmente em virtude da composição lipídica da membrana das vesículas, mas também pela atuação destas estruturas no transporte várias espécies de lipídeos, incluindo ácidos graxos, colesterol, eicosanóides, contribuindo para a regulação de lipídeos bioativos (17).

Além de lipídeos oriundos da dieta animal, os microrganismos ruminais produzem metabólitos lipídicos que apresentam propriedades bioativas relacionadas à saúde e desempenho do hospedeiro (49). Um exemplo disso é o CLA, identificado nos quatro grupos de amostra (Tabela 1), que demonstra efeitos à saúde animal, como o efeito imunomodulador (50, 51). Bactérias ruminais, incluindo *Butyrivibrio*, *Lactobacillus* e *Megasphaera* estão envolvidas diretamente no processo de biohidrogenação ruminal, que dá origem ao CLA (52), embora alguns fungos anaeróbios também apresentam essa capacidade em uma taxa mais lenta (53). Outro metabólito lipídico bioativo identificado neste estudo foi 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienóico, presente somente na fração do pellet microbiano (Tabela 1). Ele age como mediador lipídico inflamatório em ruminantes e deriva de reações enzimáticas e não enzimáticas do ácido linoléico (54). Ácidos graxos insaturados derivados do metabolismo lipídico ruminal não são utilizados como fonte direta de energia microbiana, mas podem ser incorporados aos lipídeos bacterianos (52). Entretanto, o CLA e outros ácidos graxos insaturados que passam pela reação de

biohidrogenação seguem do rúmen para o abomaso, não sendo utilizados pela microbiota ruminal (55).

Outros compostos que exibem atividades importantes também foram relatados neste estudo. A enterolactona foi observada nas amostras do líquido ruminal, *pellet* microbiano e vesículas de membrana (Tabela 1). É um enterolignano de mamíferos e um dos produtos da conversão de lignanas presentes em plantas por ação da microbiota. Em ruminantes, a conversão ocorre tanto pela microbiota ruminal como intestinal. Zhou e colaboradores (2009) demonstraram que os microrganismos ruminais realizam a conversão eficiente da lignana vegetal em enterolactona e que esta, por sua vez, pode ter efeito benéfico na fermentação ruminal, através do aumento da concentração de ácidos graxos voláteis e de proteína microbiana bruta (56). Ainda, este estudo corrobora com o observado por Cortês e colaboradores (2008), onde a conversão ruminal da enterolactona é maior do que a conversão intestinal nestes animais (57). No entanto, as vias de conversão, microrganismos envolvidos ainda não são totalmente elucidados. A presença da enterolactona nas amostras de líquido ruminal, *pellet* microbiano e vesículas de membrana, observadas neste estudo, pode ilustrar como as espécies ruminais interagem com compostos da dieta animal e do seu ambiente para produzir metabólitos que apresentam possíveis implicações para a saúde do hospedeiro e da microbiota.

A presença de N-acetiltiramina foi observada em todos os grupos neste estudo, líquido ruminal, *pellet* microbiano, sobrenadante livre de células e vesículas de membrana (Tabela 1). Esse composto já foi relatado em estudos prévios com cepas de *Streptomyces* e *Actinokineospora sp* e suas atividades biológicas descritas envolvem eliminação de radicais e atividade fungicida (58 - 60). Recentemente, Reina e colaboradores (2019) relataram pela primeira vez a ação de N-acetiltiramina como um composto inibidor do *quórum-sensing* na bactéria marinha *Vibrio alginolyticus*, demonstrando capacidade de inibir significativamente a patogenicidade bacteriana (61). Enquanto o *quórum-sensing* é meio de regulação de fatores de virulência dentro de uma microbiota, o mecanismo de inibição surge como um promissor mecanismo de prevenção a patogenicidade bacteriana. Nossos resultados podem sugerir que seja necessária uma concentração mínima da N-acetiltiramina no meio intracelular microbiano para que seja excretado para o meio extracelular ou ser enriquecido em vesículas de membrana para disseminação à distância.

Os resultados da análise proteômica (Tabela 2) demonstram que as vesículas de membrana isoladas do rúmen estão envolvidas em alguns processos biológicos. Além disso, as proteínas encontradas correspondem a resultados já relatados em outros microrganismos, fornecendo confiança no que foi obtido neste estudo. A proteína com domínio de hidrolase 4, por ser apenas predita no proteoma da bactéria ruminal *Megasphaera elsdenii* (DSM 20460), ainda não exibe uma função exata atribuída. O domínio hidrolase 4, classificado como serino aminopeptidase, é encontrado em bactérias e eucariotos, em associação à proteínas alfa/beta-hidrolases (pfam.xfam.org/family/Hydrolase_4, acesso em junho de 2021), uma superfamília que engloba enzimas hidrolíticas com diferentes origens filogenéticas e funções catalíticas, mas que compartilham uma dobra comum em sua estrutura (62, 63). As funções desta superfamília incluem éster hidrolase de ácido carboxílico, lipase, tioéster hidrolase, peptídeo hidrolase, haloperoxidase, desalogenase, epóxido hidrolase e outros (64, 65). Fundamentado nisso, a proteína com domínio hidrolase 4 encontrada nas vesículas de membrana pode estar diretamente envolvida com alguma dessas atividades enzimáticas dentro do metabolismo ruminal.

A Proteína Ribossômica 50S L7/L12 apresenta função estrutural fazendo parte da haste ribossômica, que ajuda o ribossomo a interagir com os fatores de tradução ligados ao GTP. Assim, é uma proteína essencial para o processo de tradução em bactérias (www.uniprot.org, acesso em junho de 2021). Já a lipase putativa Atg15 tem envolvimento relatado nos estágios finais da autofagia, desempenhando papel na lipólise intravacuolar de corpos autofágicos (66). Essa lipase também é responsável pela quebra de triacilglicerol em vacúolos quando a síntese *de novo* de ácidos graxos no organismo está comprometida (67) e também pode desempenhar papel de fosfolipase regulada por fator de transcrição responsivo ao estresse durante o processo de autofagia (68). Já a cadeia leve de clatrina é uma das proteínas principais para formação da estrutura final da clatrina, proteína essa que desempenha papel importante na endocitose mediada por receptor e na seleção de conteúdo a ser transportado na vesícula (69). Apesar da clatrina estar envolvida na biogênese e transporte mediado por vesículas em mamíferos, recentemente, a presença desta proteína foi relatada em vesículas extracelulares do fungo *Zyoseptoria tritici* (70), o que sustenta o resultado observado na análise de vesículas de membrana do presente estudo.

Ainda que algumas proteínas estejam localizadas em compartimentos intracelulares de eucariotos, elas também podem ser encontradas em alguns tipos de vesículas de membrana secretadas de diâmetro próximo a 200 nm (71), o que justifica a presença da lipase Atg 15 e cadeia leve de clatrina nas vesículas ruminais.

CONCLUSÃO

As vesículas são únicas, o que implica na diversidade de componentes estruturais e do tipo de conteúdo enriquecido a elas. Ainda há certa dificuldade na identificação completa de metabólitos e proteínas em estudos *in vivo* como este, uma vez que dentro de um microbioma complexo há interferências durante o processo metabólico. Ainda, muitos microrganismos ruminais permanecem desconhecidos, o que explica porque alguns compostos da análise metabolômica foram atribuídos somente à sua classe química e fórmula molecular. Isso também foi refletido na análise proteômica das vesículas, uma vez que a limitação de informações em bancos de dados sobre o proteoma de microrganismos ruminais dificulta a elucidação completa sobre o conteúdo proteico nas respectivas vesículas. Porém, todas as informações obtidas com este estudo ajudaram na dedução de algumas de suas características bioquímicas básicas. O protocolo de isolamento proposto neste estudo mostrou, pela primeira vez, que as vesículas de membrana estão presentes no rúmen. A microscopia revelou a rica diversidade de formatos e tamanhos destas vesículas isoladas. Os resultados de caracterização consolidaram a hipótese que as vesículas de membrana são secretadas pelos microrganismos ruminais para desempenhar diversas funções dentro do metabolismo do rúmen. Isso é fundamentado pela presença de lipídeos e derivadas com funções bioativas na composição metabólica das vesículas, como o CLA, mas também dos compostos enterolactona e N-acetiltiramina. Isso também é consolidado com os resultados obtidos pela proteômica das vesículas. Juntos, estes resultados revelam fortes indícios de que estas estruturas estão envolvidas em importantes processos biológicos dentro do rúmen, como o metabolismo de lipídeos, degradação de material vegetal e sinalização celular. A metabolômica e proteômica de vesículas de membranas de microrganismos ruminais ainda são um campo nascente, mas com grande potencial. A aplicação destas abordagens usando espectrometria de massa combinada com análise quimiométrica e plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* demonstrou que metabólitos e proteínas estão presentes no conteúdo das vesículas isoladas do líquido ruminal. Os

resultados obtidos com o presente estudo são os primeiros passos para a compreensão de um campo que está em constante ascensão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e coleta de líquido ruminal

Três bovinos de corte foram alimentados com silagem de milho a vontade, no período de 30 dias. Após este período, foi realizada a coleta de 500 mL do conteúdo do rúmen através de cânula ruminal, duas horas após a alimentação da manhã. O líquido ruminal de cada animal foi filtrado individualmente através de seis camadas de gaze estéril e armazenados em frascos a -20 °C. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM), sob o protocolo de número 8410230419.

Isolamento de vesículas de membrana do microbioma ruminal

O líquido ruminal foi centrifugado (Hitachi; Himac CR21G High Speed Refrigerated Centrifuges; Rotor R20A2) a 3000 g durante 30 minutos a 4 °C. O *pellet* resultante foi separado, armazenado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 20000 g durante 30 minutos a 4 °C. Esta última centrifugação foi realizada quatro vezes. O *pellet* das centrifugações foi armazenado e o sobrenadante foi filtrado em um sistema à vácuo sob pressão de 400 mmHg, utilizando uma membrana Durapore® em PVDF (Millipore) com porosidade de 0,45 µm. A filtração foi realizada duas vezes, em banho de gelo. Em seguida, o sobrenadante resultante foi ultracentrifugado (Hitachi; Himac CP90WX Preparative Ultracentrifuge; Rotor P45AT) à 120000 g durante 120 minutos à 4 °C. O *pellet* (vesículas de membrana) foi ressuscitado em tampão Tris-magnésio (pH 6,8) e filtrado utilizando uma seringa acoplada à um filtro de membrana estéril Chromafil® Xtra em PVDF com porosidade de 0,20 µm e armazenado em microtubos à -20 °C. Durante o processo, amostras do líquido ruminal bruto, *pellet* microbiano, sobrenadante livre de células também foram armazenados para análises.

Microscopia eletrônica de transmissão e *negative staining*

As amostras de vesículas de membrana dos três bovinos foram preparadas seguindo o protocolo de coloração *negative staining* de Doane e Anderson (1987) com algumas modificações (35). Para isso, 10 µL da suspensão de vesículas de membrana foram colocados sob um *grid* de 300 *mesh* cobertos com carbono formvar, formando uma gota. Após 60 segundos, o excesso de amostra foi retirado com um papel filtro. Em seguida, 10 µL de uma solução 2 % de ácido fosfotúngstico (PTA; pH 7,2) foram colocados sob o *grid* para contrastação negativa. Após 60 segundos, o excesso foi removido com papel filtro. As amostras foram visualizadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM1400 (JEOL Ltd, Japan) a 120 kV.

Extração de metabólitos para análise metabolômica

A extração dos metabólitos foi realizada nos quatro grupos de amostras referentes a cada um dos três animais: líquido ruminal bruto, *pellet* de centrifugação, sobrenadante livre de células e vesículas de membrana. O protocolo de extração foi realizado de acordo com Almeida e colaboradores (2018) com modificações (72). Para isso, 250 µL de amostra foram transferidos para frascos de vidro, seguido da adição de 500 µL do solvente extrator acetato de etila. Os frascos foram agitados em vórtex por 2 minutos e mantidos em repouso para a separação de fases. A fase orgânica foi coletada e a amostra foi novamente extraída. O processo foi repetido por mais duas vezes. A extração de cada amostra foi realizada em duplicata. As fases orgânicas foram concentradas em fluxo de nitrogênio para posterior análise por cromatografia líquida de ultra-alto desempenho acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* (UHPLC-ESI-MS/MS). Uma amostra denominada Controle de Qualidade foi preparada a partir da mistura de quantidades iguais de todos os extratos das amostras.

Análise dos extratos por UHPLC-ESI(+)-MS/MS para metabolômica não-direcionada

Os extratos foram ressuspensos em 400 µL de água:acetonitrila (1:1; v:v) e filtrados com filtro de membrana hidrofílica PTFE (Flowsupply; 0,22 µm; 13 mm). Posteriormente, 2 µL de cada extrato foram analisados usando cromatografia líquida de

ultra-alto desempenho (Shimadzu, Nexera X2, Tóquio, Japão) acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução de geometria Q-TOF (Impac II, Bruker Daltonics Corporation, Bremen, Alemanha) equipado com um fonte de ionização por *electrospray*. A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna *Intensity Solo 2 C18* (Bruker, 2,0 μm , 100 \times 2,1 mm) com uma taxa de fluxo de 0,200 mL/min. O gradiente de eluição foi realizado com um sistema de solvente binário, sendo A (H_2O com 0,1 % de ácido fórmico; v:v) e B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico; v:v). O gradiente seguiu com 5 % B 0-1 min, 50 % B 1-5 min, 70 % B 5-10 min, 95 % B 10-13 min, mantido a 95 % B 13-15 min, 5 % B 15-17 min a 40 °C, com os três minutos finais para reconstituição da coluna antes da análise seguinte. O instrumento foi calibrado utilizando os íons de uma solução de formiato de sódio (10 mmol/L de NaOH em solução de isopropanol 1:1 [v:v] contendo ácido fórmico concentrado). A fonte de ionização foi operada em modo positivo e ajustada para 3500 V, com um potencial de deslocamento da placa final de -500 V. Os parâmetros do gás de secagem foram configurados para uma taxa de fluxo de 8 L/min a 180 °C com pressão de nebulização a 4 bar. Os dados foram coletados na faixa de razão massa/carga (m/z) 50 a 1500 com uma taxa de aquisição de cinco espectros por segundo. Os três íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (auto MS/MS). Os cromatogramas foram obtidos em triplicata para cada amostra analisada.

Molecular Networking e Anotações de Metabólitos

O mapa químico (ID = 045e3f47bc2b4d42bef3e535bac63eea) foi gerado usando o fluxo de trabalho online na plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS-MN) (www.gnps.ucsd.edu, acesso em abril de 2021) (36). Os dados foram filtrados removendo todos os íons de fragmento de MS/MS dentro de unidades de ± 17 Da do precursor m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os seis picos superiores na janela de unidades de ± 50 Da em todo o espectro. Os dados foram então agrupados com MS-Cluster com uma tolerância de massa de íons precursores de 0,02 unidades de m/z e uma tolerância de íons de produto MS/MS de 0,02 unidades de m/z para criar espectros de consenso. A rede molecular foi então criada onde as linhas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,65 e mais de quatro picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós apareceu nos respectivos 10 nós mais

semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixa foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros experimentais foram comparados com as bibliotecas espectrais do GNPS, como ReSpect, Massbank, NIST14 e HMDB. Além disso, as bibliotecas espectrais de Bruker foram usadas. Os dados do MN foram exportados para o Cytoscape 3.8.0 para visualização (37). Os espectros de íons de produto com semelhanças com aqueles nas bibliotecas de espectros de massa tiveram esses espectros verificados manualmente através do software DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonik). A tolerância de erro de massa considerada foi inferior a 5 ppm.

Anotação de classes químicas através do fluxo de trabalho *MolNetEnhancer*

Para mais informações sobre as estruturas químicas presentes no mapa químico, foram utilizadas as ferramentas de anotações de estrutura *in silico* do GNPS, como *Network Annotation Propagation* (38) e *MS2LDA Substructure Discovery* (39). As informações obtidas foram incorporadas ao MN utilizando o fluxo de trabalho *MolNetEnhancer* (40) (ID=c137275179ae45a38785321fd3011dea).

Análise Quimiométrica

Os dados da análise de UHPLC-ESI(+)-MS/MS foram pré-processados através do software Profile Analysis 2.3 para gerar uma matriz com as características moleculares das amostras (tempo de retenção e m/z). As matrizes de dados foram avaliadas pelo software MATLAB R2017a[®] utilizando o pacote PLS Toolbox 7.8[®] para realização da análise de componentes principais (PCA).

Lise celular e determinação da concentração proteica

Para lise celular das vesículas de membrana, foram adicionados 20 μL de amostra em um microtubo, seguido da adição de 80 μL de tampão de lise salina (1 mol L^{-1}). As amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 10 minutos, à 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos e o pellet foi descartado. A

concentração proteica das amostras foi realizada utilizando o método de Bradford (41). Em microtubos, foram adicionados 150 μL do reagente de Bradford e 5 μL das amostras lisadas, seguido de repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura da concentração proteica foi realizada em 595 nm usando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

Preparo de amostras para digestão de proteínas

As amostras de vesículas lisadas foram ultrafiltradas utilizando o dispositivo Amicon (Millipore; Ultra 0.5; Membrana de celulose regenerada; 1000 Da), para trocar o tampão do meio. Para isso, foram adicionadas ao sistema Amicon as amostras de vesículas lisadas (tampão de lise salina; 1M) e tampão bicarbonato de amônio (50 mmol L^{-1}). Os tubos foram centrifugados em Mini Centrífuga (Kasvi; K14-0602) a 6400 rpm. As amostras foram monitoradas para que não ocorresse a completa secagem do filtro e foi novamente adicionado o tampão bicarbonato de amônio. Este processo foi feito três vezes. Ao final, foram coletadas amostras de proteínas em tampão bicarbonato de amônio.

Digestão enzimática de proteínas utilizando tripsina para análise por espectrometria de massas

A digestão de proteína foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Villén e Gygi (2008) com modificações (42). A concentração de proteínas da suspensão de vesículas de membrana dos três bovinos foi normalizada para 10 μg . As amostras foram reduzidas com 5 mmol/L de ditioneitol (DTT), por 25 minutos a 56 °C. Posteriormente, foi realizada a alquilação com 14 mmol L^{-1} de iodoacetamida, protegida da luz em temperatura ambiente, seguido de *quenching* com adição de DTT 5 mmol L^{-1} por 15 minutos com o mesmo condicionamento. Para digestão, tripsina para espectrometria de massas (Promega, EUA) foi adicionada às soluções na proporção 1:50 (enzima: substrato, v: v) e incubada a 37 °C por 16 horas. Os peptídeos obtidos foram armazenados a -80 °C até a análise.

Análise de proteômica por espectrometria de massas (LC-ESI-MSe)

A solução de peptídeos obtida com a digestão foi analisada usando um cromatógrafo líquido de ultra-alta performance ACQUITY UPLC *M-Class System* (Waters, Milford, MA) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução de tempo de voo (Xevo G2, Waters) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Acquity UPLC® M-Class HSS T3 (tamanho de partícula de 1,8 µm, 300 µm x 150 mm, Waters, Reino Unido), a uma taxa de fluxo de 6 µL/min. O gradiente da mistura de solventes A (H₂O com 0,1% de ácido fórmico; v: v) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico; v / v) foi a seguinte: 3% B (0-1 min), 40% B (1-80 min), 97% B (80-90 min), mantido em 97% B (90-97 min), 3% B (97-100 min) e mantido em 3% B (100- 103 min) a 40 °C. A tensão capilar foi operada em modo positivo, ajustada para 3,0 kV no capilar, 40 V no cone de amostragem e gás de desolvatação ajustado para 600L/h à 400 °C. Os dados foram coletados na faixa de *m/z* 50 a 2000 usando uma aquisição MSe, tempo de varredura = 0,5 e energia de colisão de rampa 15-45 V. Os arquivos de dados (brutos) da análise foram processados e analisados usando o software ProteinLynx Global Server™ 3.0.3. Os bancos de dados utilizados no processamento foram de Vesículas de Membrana, Rúmen e Swissprot, disponibilizados no Uniprot (www.uniprot.org, baixados em março de 2021). Os seguintes parâmetros foram usados para pesquisas de banco de dados: especificidade de clivagem, tripsina com 1 clivagem perdida permitida; correspondências de íon de fragmento mínimo por peptídeo = 2; correspondências de íon de fragmento mínimo por proteína = 5; correspondências mínimas de peptídeo por proteína = 1; reagente modificador fixo: carbamidometil C; reagentes modificadores variáveis: oxidação M.

REFERÊNCIAS

1. Hungate RE. 1966. *The Rumen and its Microbes*. New York, London: Academic Press.
2. Russel JB. 2002. *Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition*. New York State College of Agriculture and Life Sciences.
3. Uyeno Y. 2015. Selective Inhibition of Harmful Rumen Microbes. In: Puniya AK, Singh R, Kamra DN. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer 199-211.
4. Li RW. 2015. Rumen Metagenomics. In: Puniya AK, Singh R, Kamra DN. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* 223-245.
5. Zhou M, Chen Y, Guan LL. 2015. Rumen Bacteria. In: Puniya AK, Singh R, Kamra DN. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer.
6. Cheng KJ, McCowan RP, Costerton JW. 1979. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *Am J Clin Nutr* 32:139-148.
7. McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 72:3004-3018.
8. Huws SA, Mayorga OL, Theodorou MK, Onime LA, Kim EJ, Cookson AH, Newbold CJ, Kingston-Smith AH. 2013. Successional colonization of perennial ryegrass by rumen bacteria. *Lett Appl Microbiol* 56:186-196.
9. Schooling SR, Beveridge TJ. 2006. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 188:5945-5957.
10. Whitworth DE. 2011. Myxobacterial vesicles: death at a distance? *Adv Appl Microbiol* 75:1-31.
11. Schwechheimer C, Sullivan CJ, Kuehn MJ. 2013. Envelope control of outer membrane vesicle production in gram-negative bacteria. *Biochemistry* 52:3031-3040.
12. Wolf JM, Rivera J, Casadevall A. 2012. Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles. *Cell Microbiol* 14:762-773.
13. Olaya-Abril A, Prados-Rosales R, McConnell MJ, Martín-Peña R, González-Reyes JA, Jiménez-Munguía I, ... Rodríguez-Ortega MJ. 2014. Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteom* 106:46-60.
14. Toyofuku M. 2019. Bacterial communication through membrane vesicles. *Biosci Biotechnol Biochem* 83:1599-1605.

15. Orench-Rivera N, Kuehn MJ. 2016. Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cell Microbiol* 18:1525-1536.
16. Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:255-289.
17. Van Niel G, d'Angelo G, Raposo G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:213-228.
18. Ellis TN, Kuehn MJ. 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Ver* 74:81-94.
19. Klieve AV, Yokoyama MT, Forster RJ, Ouwerkerk D, Bain PA, Mawhinney EL. 2005. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus spp.* of ruminal origin. *Appl Environ Microbiol* 71:4248-4253.
20. Macdonald IA, Kuehn MJ. 2013. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 195:2971-2981.
21. Mashburn LM, Whiteley M. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437:422-425.
22. Caruana JC, Walper S.A. 2020. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe–microbe and microbe–host community interactions. *Front Microbiol* 11:432.
23. Thiery S, Kaimer C. 2020. The predation strategy of *Myxococcus xanthus*. *Front Microbiol* 11:2.
24. Kulp A, Kuehn M. 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* 64:163-184.
25. Turpin D, Truchetet ME, Faustin B, Augusto JF, Contin-Bordes C, Brisson A, Blanco P, Duffau P. 2016. Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 15:174-183.
26. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJ, Vader P. 2018. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol* 9:738.
27. Micoli F, MacLennan CA. 2020. Outer membrane vesicle vaccines. In *Seminars in Immunology* 101433. Academic Press.
28. Li M, Zhou H, Yang C, Wu Y, Zhou X, Liu H, Wang Y. 2020. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. *J Control Release* 323:253-268.
29. Arntzen MØ, Várnai A, Mackie RI, Eijsink VG, Pope PB. 2017. Outer membrane vesicles from *Fibrobacter succinogenes* S85 contain an array of carbohydrate-active

enzymes with versatile polysaccharide-degrading capacity. *Environ Microbiol* 19:2701-2714.

30. Edwards JE, McEwan NR, Travis AJ, John Wallace R. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:263-281.

31. Kim M, Morrison M, Yu Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol Ecol* 76:49-63.

32. Bouslimani A, Sanchez LM, Garg N, Dorrestein PC. 2014. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Nat Prod Rep* 31:718-729.

33. Emidio NB, Carpanez AG, Quellis LR, Farani PS, Vasconcelos EG, Faria-Pinto P. 2015. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. *HU Revista* 41:3 e 4.

34. Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. 2005. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev* 24:613-646.

35. Doane FW, Anderson N. 1987. Electron Microscopy in Diagnostic Virology. A Practical Guide and Atlas. *Cambridge University Press* 25-26.

36. Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, ... Bandeira N. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 34:828-837.

37. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498-2504.

38. da Silva RR, Wang M, Nothias LF, van der Hooft JJ, Caraballo-Rodríguez AM, Fox E, ...Dorrestein PC. 2018. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. *PLoS Comput Biol* 14:e1006089.

39. van Der Hooft JJJ, Wandy J, Barrett MP, Burgess KE, Rogers S. 2016. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proc Natl Acad Sci* 113:13738-13743.

40. Ernst M, Kang KB, Caraballo-Rodríguez AM, Nothias LF, Wandy J, Chen C, ...Van Der Hooft JJ. 2019. MolNetEnhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites* 9:144.

41. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

42. Villén J, Gygi SP. 2008. The SCX/IMAC enrichment approach for global 820 phosphorilation analysis by mass spectrometry. *Nat Protocol* 3:1630- 1638.

43. Fulsundar S, Harms K, Flaten GE, Johnsen PJ, Chopade BA, Nielsen KM. 2014. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Appl Environ Microb* 80:3469-3483.
44. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* 17:13–24.
45. Wei X, Vassallo CN, Pathak DT, Wall D. 2014. Myxobacteria produce outer membrane-enclosed tubes in unstructured environments. *J Bacteriol* 196:1807-1814.
46. Baidya AK, Bhattacharya S, Dubey GP, Mamou G, Ben-Yehuda S. 2017. Bacterial nanotubes: a conduit for intercellular molecular trade. *Curr Opin Microbiol* 42:1–6.
47. Potter M, Hanson C, Anderson AJ, Vargis E, Britt DW. 2020. Abiotic stressors impact outer membrane vesicle composition in a beneficial rhizobacterium: Raman spectroscopy characterization. *Scientific reports* 10:1-14.
48. Aggio RB, Ruggiero K, Villas-Bôas SG. 2010. Pathway activity profiling (PAPi): From the metabolite profile to the metabolic pathway activity. *Bioinformatics* 26: 2969–2976.
49. Saika A, Nagatake T, Kunisawa J. 2019. Host-and microbe-dependent dietary lipid metabolism in the control of allergy, inflammation, and immunity. *Front Nutr* 6:36.
50. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8:1881-1887.
51. Hayek MG, Han SN, Wu D, Watkins BA, Meydani M, Dorsey JL, Meydani SN. 1999. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *J Nutr* 129:32-38.
52. Arrigoni MDB, Martins CL, Factori MA. 2016. Lipid metabolism in the rumen. In *Rumenology* 103-126. Springer, Cham.
53. Nam IS, Garnsworthy PC. 2007. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J Appl Microbiol* 103:551-556.
54. Contreras GA, De Koster J, de Souza J, Laguna J, Mavangira V, Nelli RK., Gandy J, Lock AL, Sordillo LM. 2020. Lipolysis modulates the biosynthesis of inflammatory lipid mediators derived from linoleic acid in adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 103:1944-1955.
55. Hess BW, Moss GE, Rule DC. 2008. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. *J Dairy Sci* 86:188-204.
56. Zhou W, Wang G, Han Z, Yao W, Zhu W. 2009. Metabolism of flaxseed lignans in the rumen and its impact on ruminal metabolism and flora. *Anim. Feed Sci. Technol* 150:18–26.

57. Côrtes C, Gagnon N, Benchaar C, Da Silva D, Santos GTD, Petit HV. 2008. *In vitro* metabolism of flax lignans by ruminal and faecal microbiota of dairy cows. *J. Appl. Microbiol* 105:1585–1594.
58. Zhao PJ, Li GH, Shen YM. 2006. New chemical constituents from the endophyte *Streptomyces* species LR4612 cultivated on *Maytenus hookeri*. *Chem Biodivers* 3:337-342.
59. Heidari B, Mohammadipanah F. 2018. Isolation and identification of two alkaloid structures with radical scavenging activity from *Actinokineospora* sp. UTM 968, a new promising source of alkaloid compounds. *Mol Biol Rep* 45:2325-2332.
60. Garcez WS, Martins D, Garcez FR, Marques MR, Pereira AA, Oliveira LA, Rondon JN, Peruca AD. 2000. Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye leaf spot and stem canker-resistant and-susceptible soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *J Agric Food Chem* 48:3662-3665.
61. Reina JC, Pérez-Victoria I, Martín J, Llamas I. 2019. A quorum-sensing inhibitor strain of *Vibrio alginolyticus* blocks Qs-controlled phenotypes in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine drugs* 17:494.
62. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, ... Goldman A. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng Des Sel* 5:197-211.
63. David LO, Paul DC. 2009. A/b-hydrolase fold: An update. *Protein Pept Lett* 16:1137-1148.
64. Holmquist M. 2000. Alpha beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* 1:209-235.
65. Li F, Fei X, Xu J, Ji C. 2009. An unannotated α/β hydrolase superfamily member, ABHD6 differentially expressed among cancer cell lines. *Mol Biol Rep* 36:691-696.
66. Teter SA, Eggerton KP, Scott SV, Kim J, Fischer AM, Kliensky DJ. 2001. Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem* 276:2083-2087.
67. van Zutphen T, Todde V, de Boer R, Kreim M, Hofbauer HF, Wolinski H, Veenhuis M, der Klei IJ, Kohlwein SD. 2014. Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biology Cell* 25:290-301.
68. Ramya V, Rajasekharan R. 2016. ATG 15 encodes a phospholipase and is transcriptionally regulated by YAP 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 590:3155-3167.
69. Newpher TM, Idrissi FZ, Geli MI, Lemmon SK. 2006. Novel function of clathrin light chain in promoting endocytic vesicle formation. *Mol Biology Cell* 17:4343-4352.
70. Hill EH, Solomon PS. 2020. Extracellular vesicles from the apoplastic fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Biol Biotechnol* 7:1-14.

71. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, ... Jovanovic-Taliman T. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7:1535750.
72. De Almeida RTR, Do Prado RM, Porto C, Dos Santos GT, Huws SA, Pilau EJ. 2018. Exploring the rumen fluid metabolome using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and Molecular Networking. *Scientific reports*, 8:1-8.