

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MEDICINA VETERINÁRIA

**MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS E A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS (*Bos taurus*)**

UBERLÂNDIA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUCAS MELO GONÇALVES

**MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS E A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS (*Bos taurus*)**

Monografia apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia para o
Trabalho de Conclusão de Curso II

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Co-orientador: Ms. Muller Carrara Martins

UBERLÂNDIA

2020

LUCAS MELO GONÇALVES

**MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS E A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS (*Bos taurus*)**

Monografia apresentada a Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia, como
parte das exigências para obtenção do título
de Bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 11 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos

Prod. Dr. José Octavio Jacomini

Dedico esse trabalho à minha avó, Rosa e ao meu Tio, Sérgio. Por serem meus maiores exemplos de altruísmo inigualável e por me ensinarem que bons resultados se constroem a partir de um trabalho árduo e dedicação!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, por tantos ensinamentos, lições de vida, amizade e por ser esse exemplo de profissional que me espelha, transbordando ética, respeito, criatividade e conhecimento. Obrigado por tanto!

Agradeço a todos os membros e ex-membros do Laboratório de Biologia da Reprodução, onde passei os melhores anos de minha faculdade, conheci amigos que levarei para a vida e adquiri conhecimentos que me deixam cada vez mais perto de me tornar um bom profissional. “Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá em grupo!”. Em especial agradeço ao meu Co-orientador e amigo, Ms. Muller Carrara, por tantas coisas que passamos juntos, e hoje lhe aponto como responsável do amadurecimento profissional que tive!

Agradeço a toda comunidade FAMEV-UFU. Em especial aos Professores Robson, Jacomini, Francisco, Márcio e Diego Delfiol, pela grande afinidade que me proporcionou a oportunidade de poder explorar e aprender muito mais com esses exemplos de profissionais, além de ter ganhado bons amigos.

Agradeço a Professora Ricarda, uma grande amiga, pelos conselhos, risadas, presença em tantos momentos importantes e, principalmente por guiar meus caminhos e me tornar um grande profissional, mesmo que com seu jeito “levemente agressivo” de me ensinar.

Agradeço a minha família, por todo o apoio e torcida em cada etapa da minha vida!

Agradeço meus amigos Matheus, Iago Leão, Victor, Arthur, Guilherme, Danilo, Hudson, Rafael, Fausto, Robert, Pedro, Leonardo, Marco, Iago Santos, Gustavo, Yago, Pâmella, Viviane, Natália, Amanda, Juliana, Bruna, Giovanna, Maria, entre outros. Vocês viraram minha família e estarão sempre no meu coração.

Por último agradeço minha namorada, Stefani, a melhor pessoa que conheço nesse mundo e tenho o prazer de dividir e dedicar cada conquista de minha vida! Se hoje eu sou alguém melhor que ontem, é porque você nunca soltou da minha mão.

*“Every dream that you leave behind is a piece of your
future that ceases to exist” (Steve Jobs, 2012)*

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE), é uma biotecnologia reprodutiva, altamente explorada na produção de bovinos e carece de estudos para melhorar cada vez mais. Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que participam de processos epigenéticos em diversas funções biológicas, inclusive em vias fisiológicas reprodutivas. Objetivou-se nesse estudo correlacionar, através de análises *in silico*, os microRNAs isolados de cabeças de espermatozoides de touros, utilizando o kit *mirVana™ miRNAisolation*, com a eficiência desses reprodutores na Produção *in vitro* de Embriões. Realizou-se uma análise transcriptômica por meio de dois *softwares* de normalização e filtragem (DESeq2 e edgeR) e rotinas de PIVE dos espermatozoides de touros com diferentes níveis de eficiência. Descobriu-se que a alta expressão do miR-425-5p (P=0,01 DESeq2; P= 0,04 edgeR) afetou positivamente a taxa de formação de blastocistos na PIVE e que a alta expressão do miR-11972 (P= 0,03 DESeq2; P= 0,008 edgeR) e miR-11975/miR-11976 (P= 0,05 DESeq2; P= 0,03 edgeR) afetou negativamente a taxa de formação de blastocisto na PIVE. Portanto, concluiu-se nesse trabalho que esses microRNAs possuem potencial para serem utilizados como biomarcadores de fertilidade de touros submetidos a Produção *in vitro* de Embriões, além de serem sido identificados como futuros alvos de estudos para a maior compreensão do processo de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial e principalmente para melhoria da tecnologia em questão.

Palavras-chave: miRNA, espermatozoide, PIVE, embrião.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVEP) is a reproductive biotechnology, highly exploited in cattle production and needs studies to improve it even more. MicroRNAs are small, non-coding RNA molecules that participate in epigenetic processes in various biological functions, including reproductive physiological pathways. The aim of this study was to correlate, through *in silico* analyzes, the microRNAs isolated from sperm heads of bulls, using the mirVana™ miRNA isolation kit, with the efficiency of these breeders in the *in vitro* embryo production. A transcriptomic analysis was performed through of two normalization and filtering software (DESeq2 and edgeR) and PIVE routines of bull sperm with different levels of efficiency. It was found that a high expression of miR-425-5p (P = 0.01 DESeq2; P = 0.04 edgeR) positively affected a blastocyst formation rate in PIVE and that a high expression of miR-11972 (P = 0.03 DESeq2; P = 0.008 edgeR) and miR-11975 / miR-11976 (P = 0.05 DESeq2; P = 0.03 edgeR) negatively affected the rate of blastocyst formation in PIVE. Therefore, it was concluded that these microRNAs have the potential to be used as fertility biomarkers of bulls submitted to in vitro embryo production, in addition to being identified as future study targets for a better understanding of the process of fertilization and earlier embryonic development and mainly to improve the technology in question.

Key words: miRNA, spermatozoa, IVPE, embryo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Epigenética.....	12
2.2. MicroRNAs	13
2.3. Espermatogênese, maturação espermática e microRNAs espermáticos	14
2.4. Desenvolvimento embrionário e microRNAs envolvidos	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Amostras de sêmen	18
4.2. Seleção espermática e purificação das amostras	18
4.3. Isolamento de miRNA	19
4.4. Sequenciamento de RNAs (RNA-seq)	20
4.5. Identificação dos microRNAs nas amostras sequenciadas	20
4.6. Análise de expressão diferencial e correlação com resultados das PIVEs ..	21
4.7. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	21
4.7.1. Obtenção e seleção de ovócitos.....	22
4.7.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	22
4.7.3. Seleção espermática	22
4.7.4. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	23
4.7.5. Cultivo <i>in vitro</i>	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	31

REFERÊNCIAS	32
-------------------	----

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, o Brasil possui um importante papel no desenvolvimento de produtos de origem animal, principalmente na bovinocultura, visto que o país se destaca na produção de leite e, principalmente, de carne. Com grande participação no abastecimento mundial em um mercado cada vez mais exigente, o sistema de produção brasileiro carece de intensificação, assim, as biotecnologias de reprodução permitem que os progenitores, de genética superior, tenham um maior número de descendentes ao longo de suas vidas. Permitem também, melhoria genética de diversas características no rebanho e um produto final de maior qualidade e rentabilidade para o sistema.

Desse modo, uma importante biotecnologia usada para tal intensificação é a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a qual permite fazer o processo de fertilização dos ovócitos e o desenvolvimento embrionário inicial, em um ambiente controlado. Apesar da PIVE ter grandes vantagens, ainda precisa ser mais bem compreendida para alcançar maior eficiência, já que apenas 30% dos ovócitos maturados *in vitro* avançam ao estágio de blastocisto (MELLO et al., 2016). Assim sugere-se que diversos eventos fisiológicos/moleculares do processo de gametogênese, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial devem ser melhor compreendidos para maior eficiência da PIVE.

Com o avanço da biologia molecular, novos mecanismos são descobertos e explorados atualmente, como exemplo, hoje conhece-se os microRNAs, que são uma classe de RNAs não codificantes que agem na supressão gênica de forma pós-transcricional em inúmeros processos biológicos, como apoptose celular, proliferação celular, resposta ao estresse e metabolismo (ZHANG et al., 2016). A atuação dos microRNAs tem sido relatada em diversos estudos na oncologia, com importante papel em processos de oncogênese em inúmeras neoplasias e resistência a quimioterápicos, além disso, são identificados constantemente como biomarcadores de prognósticos e como alvos de terapia (FANG et al., 2017; LIU et al., 2019; SUN et al., 2016).

Novos estudos mostram que esses microRNAs estão associados também a vias fisiológicas do processo reprodutivo, já que foram descritas funções no gameta

masculino, gameta feminino, processo de fertilização, desenvolvimento embrionário inicial e sucesso na gestação (ALMIÑANA; BAUERSACHS, 2020). Assim, estão fortemente envolvidas no desenvolvimento *in vitro* de embriões, já que Kropp, Salih e Khatib (2014) relataram um perfil variado de miRNAs em meios de cultivo (CIV) de embriões oriundos de PIVE, em bovinos, relacionados com embriões de alta qualidade ou embriões degenerados.

Além disso, sabe-se que espermatozoides não são apenas meros transportadores inertes do genoma masculino, mas sim estruturas altamente organizadas e condutoras metabolicamente ativas desse material genético (BELETTI 2013), já que os miRNAs espermáticos foram relatados nas diferentes fases do processo de espermatogênese (ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2020), na capacitação espermática (LI et al., 2018) e alguns foram positivamente ou negativamente associados com a taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário e qualidade embrionária em camundongos (XU et al., 2020).

Portanto, é possível afirmar que os microRNAs espermáticos possuem grande importância para os processos da fertilidade e concepção de muitas espécies, e o conhecimento desses pode levar a melhoria da biotecnologia aqui explorada. Assim, objetivou-se com presente trabalho verificar a relação entre os microRNAs espermáticos e a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epigenética

A epigenética, se define como a área de estudo do controle de diversas mudanças fenotípicas que resultam da expressão genética, e não de mudanças do código genético (AJONIEBU et al., 2017), ou seja, essa ciência busca a compreensão entre a mudança da expressão genômica individual com a variação ambiental do indivíduo (JAENISCH; BIRD, 2003), por meio de mecanismos moleculares como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação (RENTHAL; NESTLER, 2009) e microRNAs (CHUANG; JONES, 2007). Assim é descrito que a epigenética possui importantes ações no desenvolvimento embrionário inicial, principalmente em função de miRNAs carregados por espermatozoides (XU et al., 2020; BREVIK et al., 2012).

2.2. MicroRNAs

Os micro-RNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes nos quais atuam no silenciamento pós-transcricional de genes, por meio do impedimento da tradução de diversos mRNAs (VASHISHT; GAHLAY, 2020), por degradação ou inibição (MELLO, 2007), além disso, foi relatado que cerca de 30% da codificação de proteínas em humanos, é controlada por esses fatores (HA, 2011).

O processo de biossíntese e ação (Figura 1) começa no núcleo celular com a transcrição do gene do miRNA pela RNA polimerase II ou RNA polimerase III, no qual forma a estrutura primária de miRNA (pri-miRNA) que por sua vez é metilada e processada por um complexo enzimático (Drosha/DGCR8) que forma um pré-microRNA (pre-miRNA) (WINTER et al., 2009). O pre-miRNA é exportado para o citoplasma através da proteína de canal Exportina, onde é processado por duas proteínas, Dicer (proteína de ligação de RNA responsiva a trans-ativação) e TRBP (proteína de ligação de RNA) no qual formam um miRNA-duplex. Agora esse miRNA está maduro, e junto com a proteína argonauta (AGO2) forma o complexo RISC (VASHISHT; GAHLAY, 2020).

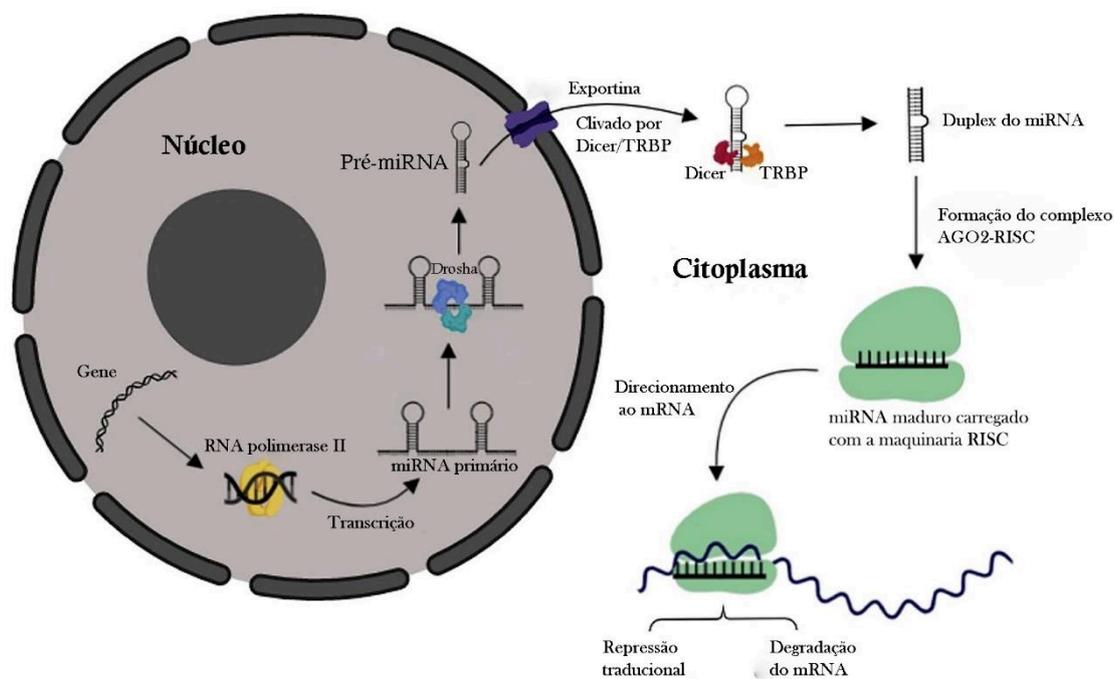
O complexo RISC (complexo silenciador induzido por RNA), se liga ao RNA mensageiro alvo e regula a repressão da tradução ou até mesmo faz a degradação da molécula (TURCHINOVICH et al., 2011). Esses miRNAs podem ter diversos ou apenas um gene alvo na célula, através de uma pequena região do miRNA com complementariedade com o mRNA do gene alvo (BARTEL, 2009). Esse processo de síntese e ação é ilustrado pela figura 1.

Estudos mostram que esses miRNAs possuem importantes papéis em diversos eventos fisiológicos e patológicos, como proliferação celular, apoptose, resposta ao estresse, metabolismo, angiogênese, etc (SUN et al., 2017).

Esses eventos podem auxiliar direta ou indiretamente o processo reprodutivo, pois foi relatado a existência de miRNAs com atuação em células tronco embrionárias (TUFEKCI et al., 2014), participação de eventos do ciclo estral (ALMIÑANA et al., 2018), clivagem e implantação do embrião (FERESHTEH et al., 2018), crescimento folicular e maturação ovocitária (ALMIÑANA; BAUERSACHS, 2020), capacitação espermática (LI et al., 2018), espermatogênese e qualidade seminal

(KASIMANICKAM et al., 2019) e reconhecimento materno da gestação (MEYER et al., 2019).

Figura 1: Ilustração representativa do processo de biossíntese e mecanismo de ação dos microRNAs.



Fonte: Adaptado de Vashisht e Gahlay (2020).

2.3. Espermatogênese, maturação espermática e microRNAs espermáticos

A espermatogênese é uma série de divisões mitóticas e meióticas de espermatogônias que originam os espermatozoides nos túbulos seminíferos. Após o surgimento da espermatogônias B através de mitoses, e essas entram em processo de meiose para formar os espermatócitos primários que sofrem a primeira divisão meiótica até originar os espermatócitos secundários; esses se dividem novamente até formar as espermatídes (células haploides esféricas) que sofrem mudanças na sua forma e composição, e assim tem-se o espermatozoide como resultado do processo (RAHMAN et al., 2017). Esse processo de formação do gameta masculino pode ser dividido em duas fases, a espermatocitogênese, que é o processo da formação das espermatídes a partir de espermatogônia e a espermiogênese, que se define pelo processo de formação de espermatozoides a partir das espermatídes (GARCIA, 2017). Após essa fase, forma-se o espermatozoide funcional, que possui dois

principais componentes, a cabeça, formada por acrossoma, núcleo, citoplasma e estruturas do citoesqueleto e o flagelo (EDDY, 2006).

Segundo Legrand e Hobbs (2017), a espermatogênese é indispensável para transmitir carga genética e garantir a sobrevivência geral de uma espécie. A produção de gametas maduros é um processo regulado por 1500 a 2000 genes, então, as alterações nesses genes podem influenciar na fertilidade (RAZAVI et al. 2017), já que o controle da expressão gênica e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário inicial pode ser influenciado por espermatozoides (BELETTI, 2013), pois, estudos recentes relatam que no desenvolvimento do espermatozoide de mamíferos, existe uma pequena carga de RNA que sofre uma severa remodelação e assim formam os microRNAs (CONINE et al., 2018).

A expressão de microRNAs acontece de forma específica por cada célula envolvida na espermatogênese, e assim garantem cada etapa da formação do gameta (KOTAJA, 2014). Alguns trabalhos mostraram que a deleção de enzimas responsáveis pela biogênese dos miRNAs, como a Dicer 1 e Dgcr8, impediram tanto o processo de desenvolvimento de células primordiais (HAYASHI et al., 2008), quanto o processo de espermatogênese e maturação espermática (ROMERO et al., 2011).

Assim, o epidídimo é uma importante estrutura do trato reprodutivo masculino que desempenha diversas tarefas na maturação final do espermatozoide a partir de vesículas extra-celulares, chamadas de epididimossomos, que podem exportar o conteúdo produzido pelo epitélio até o espermatozoide na luz do órgão (HOOG; LOTVALL, 2015). Jerczynski e colaboradores (2016), relataram que existe um perfil de microRNAs, diferencialmente expressos e secretados nas diferentes porções do epidídimo, ou até mesmo em processos que precedem a maturação epididimária, nos quais possuem inúmeros alvos nas mais diversas etapas da espermatogênese e também no processo de fertilização.

Como já dito, o conteúdo de microRNAs secretados pelas diferentes porções do epidídimo é diferente, já que essas possuem várias vias de sinalizações nos processos reprodutivos, assim algumas delas são associadas positivamente e outras negativamente com o sucesso da gametogênese, fertilização e desenvolvimento embrionário (NIXON et al., 2015).

Essas moléculas não possuem apenas funções ligadas ao macho, pois diversos microRNAs espermáticos de cachacos tiveram diferentes papéis na fertilidade em suínos, com sinalizações em inúmeras vias que agiam no trato reprodutivo de marrãs (ALVAREZ- RODRIGUES et al., 2020).

Em contramão aos dados referidos anteriormente, Alvarez-Rodriguez e colaboradores (2020) mostraram que alguns miRNAs que não estão envolvidos no processo de maturação espermática estavam presentes em espermatozoides ejaculados, mas essas moléculas não podem estar funcionais em eventos após a maturação até o início da fertilização, já que nesse momento a cromatina espermática está altamente compactada por protaminas e com baixa atividade de transcrição e tradução (GRUNEWALD et al., 2005), então esses microRNAs podem ser apenas resquícios da espermatogênese no testículo.

Portanto, pode se dizer que o processo de espermatogênese e maturação espermática estão associados ao perfil de microRNAs nos espermatozoides, que desempenham importantes tarefas que levam ou não ao sucesso reprodutivo.

2.4. Desenvolvimento embrionário e microRNAs envolvidos

Hiraiwa (2015) relata que até pouco tempo atrás acreditava-se que o espermatozoide era uma célula simples cuja função era simplesmente o carreamento do genoma masculino, entretanto o estudo transcriptômico fornece grande entendimento a respeito da formação embrionária.

Existe na literatura o levantamento que mostra a existência de microRNAs essenciais tanto para a fertilização quanto para o desenvolvimento embrionário inicial (OSTERMEIER, 2002). Dadoue (2009) mostrou que os microRNAs são um tipo de RNA presente nos espermatozoides de mamíferos de grande importância, pois esses estão intimamente ligados com eventos da embriogênese por serem reguladores de vários genes (KUMAR et al., 2013).

Isso se confirma por diversos estudos, como os experimentos de Liu e colaboradores (2012) que mostrou a transmissão de um tipo específico de miRNA (miR-34c), participava da primeira divisão mitótica do zigoto de ratos, além de realizar o transcriptoma desse zigoto e identificar 16 tipos de miRNA que provavelmente tenham um importante papel no início da formação do embrião.

Outros vários estudos mostraram a importância de microRNAs no processo de desenvolvimento embrionário inicial, no qual aparecem em correlação positiva com a taxa de clivagem e implantação (FERESHTEH et al., 2018) e qualidade embrionária (XU et al., 2020). Além disso, foi encontrado alguns miRNAs com células tronco embrionárias como único alvo, assim esses estiveram em regulação positiva em embriões em crescimento comparado aos sem crescimento (KIM; LEE; JUM, 2018; SUH et al., 2004), como por exemplo o miR-17-5p, foi identificado no fluido de blastocite em embriões de camundongo, esteve diferencialmente expresso no desenvolvimento embrionário inicial, com provável participação na diferenciação de células tronco (BATTAGLIA et al., 2019).

Entretanto, alguns microRNAs também foram negativamente associados com o desenvolvimento embrionário, como por exemplo o miR-let-7a e miR-23a, foram diferencialmente expressos em blastocistos sem crescimento (KIM; LEE; JUN, 2018).

Pohler e colaboradores (2017), levantaram a hipótese de que miRNAs derivados de vesículas influenciam no desenvolvimento inicial da gestação em vacas, com importante participação nos mecanismos fisiológicos que levam o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Isso se confirmou na revisão de Almiñana e Bauersachs (2020), no qual mostraram que não só em bovinos, mas em diversas outras espécies, várias vesículas extracelulares derivadas de oviduto ou embrião, contendo diversos microRNAs, desempenharam tarefas importantes que levaram ao sucesso reprodutivo, com ação em espermatozoides e ovócitos e principalmente pela comunicação do embrião com a placenta, tuba uterina e com outros embriões.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Objetivou-se com este estudo identificar os microRNAs presentes em espermatozoides bovinos e associá-los à eficiência da produção *in vitro* de embriões e assim, coloca-los como possíveis marcadores de sucesso ou não desta biotécnica.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar os miRNAs espermáticos bovinos.
- Correlacionar os miRNAs espermáticos com as taxas de clivagem *in vitro* (FIV).
- Correlacionar os miRNAs espermáticos com as taxas de blastocistos *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras de sêmen

Foram utilizadas seis amostras de sêmen, coletadas por eletroejaculação, de três touros da raça Girolando, oriundos da fazenda Capim Branco da Universidade Federal de Uberlândia e outros três touros da raça Guzerá, oriundos da fazenda experimental da Universidade de Uberaba. Imediatamente após a coleta, as amostras foram diluídas no meio TRIS-gema (2,5% (p/v) de TRIS (hidroximetil amino metano), 20,00% (v/v) de gema de ovo, 1,3% (p/v) de ácido cítrico, 1,0% (p/v) de frutose, 0,13% (v/v) de sulfato de gentamicina, em água destilada, pH 7.4) na concentração de um para um, com o intuito de manter os espermatozoides viáveis ao decorrer do processamento. Assim, após contagem de células por uma câmara de *Neubauer*, as amostras foram novamente diluídas e padronizadas em uma concentração de 80 milhões de espermatozoides por mL de meio Tris-gema adicionado de glicerol (6,5% (v/v)) e posteriormente envasadas em palhetas de 0,5 mL. Posteriormente, essas foram congeladas automaticamente pelo congelador TK (Uberaba, MG, Brasil) modelo 3000 Compacta, pela curva de congelação P2S1. Após esse processo, as palhetas congeladas foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C para posterior uso em rotinas de produção *in vitro* de embriões e sequenciamento dos miRNAs espermáticos. Baseado nos resultados das PIVs as amostras foram divididas em dois grupos: Resultado ruins nas PIVEs e resultados bons nas PIVEs

4.2. Seleção espermática e purificação das amostras

As amostras de sêmen utilizadas para o processo de isolamento dos miRNAs, foram submetidas ao processo de seleção espermática por gradiente de *Percoll*

(AVERY & GREVE, 1995), a fim de purificá-las de quaisquer contaminantes como células somáticas, espermatozoides patológicos e diluente.

Para a seleção espermática, as palhetas de sêmen foram descongeladas em um banho maria a 37° por 40 segundos, depositadas em um tubo do tipo Falcon de 15 ml sobre a solução contendo um mL de *Percoll* a 45% e um mL de *Percoll* a 90%, ambas as concentrações diluídas em meio Sperm-Talp, previamente estabilizado por 02 horas em uma estufa à 38,5°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1400 g por 30 min, assim formou-se um pellet de espermatozoides viáveis. Para a retirada do *Percoll*, o sobrenadante do tubo foi descartado e o pellet ressuscitado em 0,5 mL de PBS, e assim a solução foi novamente centrifugada a 1400 g por 20 minutos. Logo após, esta etapa foi repetida mais duas vezes.

4.3. Isolamento de miRNA

Foi utilizado o kit *mirVana™ miRNAisolation* (Invitrogen) (cat. num: AM1560) para o procedimento. Primeiramente, foi feita a ressuspensão do pellet oriundo da seleção espermática em 300 µL de *lysis/bindingsolution*, então o tubo foi agitado em um vórtex por 1 minuto, até a obtenção de um lisado homogêneo. Logo após, adicionou-se 30 µL de *miRNA Homogenate Additive* a amostra, agitada novamente por 1 minuto e então essa mistura foi deixada no gelo por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 300 µL de Ácido-Fenol Clorofórmio e foi agitado no vórtex por 2 minutos, posteriormente a solução foi centrifugada em 1000 g por 15 segundos. Após esse processo, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 470 µL de etanol 100%. Assim, a solução foi transferida para um tubo no qual possuía um filtro de sílica e este foi centrifugado a 1000 g por 15 segundos, então o líquido foi descartado e o processo repetido até que toda a mistura do lisado com etanol fosse filtrada. Após o processo de filtragem, o líquido foi descartado e adicionou-se 500 µL de *miRNAWashSolution 2/3* a coluna, seguido de uma centrifugação a 1000 g por 10 segundos. Por último, os RNAs foram eluídos com 100 µL de *elutionsolution* a 100°C estabilizados com tubos RNA stable® / LD (Biomatricacatalog #90221-001) e foram deixados para secar em uma câmara a vácuo em *overnight*.

Após esse protocolo, os tubos estabilizadores contendo as amostras de RNAs foram selados e mantidos a temperatura ambiente em uma câmara a vácuo, para evitar alta umidade, até que fossem enviadas a etapa de sequenciamento.

4.4. Sequenciamento de RNAs (RNA-seq)

As amostras de miRNA foram submetidas a construção de biblioteca utilizando o kit RealSeq®-AC (Small RNA SomaGenics®), conforme instruções do fabricante e a fração correspondente aos pequenos RNAs foi purificada em gel. As bibliotecas foram sequenciadas utilizando a IlluminaNextSeq™ 500 V2 high-output 75 ciclos conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram filtradas por qualidade utilizando o software FastQC e as reads com score de qualidade menor que 25 foram contadas e descartadas. Para eliminação dos adaptadores, as reads foram processadas utilizando o software Trimmomatic. Todas as sequências foram contadas e mapeadas no genoma de *Bos taurus* (urlgenome).

Para a análise dos pequenos RNAs, apenas reads de comprimento compreendido entre 15 e 35 nucleotídeos foram selecionadas; as demais reads foram contadas e descartadas dessa análise. Para quantificação das reads identificadas como RNAs não codificadores de proteínas, exceto piRNAs e miRNAs, tais como tRNA, rRNA, snoRNA, snRNA entre outros foi utilizado o banco de dados Rfam e a ferramenta Blastn. Apenas reads com identidade e cobertura superior a 95% bem como tamanho de 15 nucleotídeos no alinhamento do Blastn foram aceitas para identificação dos pequenos RNAs citados acima. A avaliação dos miRNAs foi realizada utilizando o software miRDeep 2.

4.5. Identificação dos microRNAs nas amostras sequenciadas

Dos resultados do sequenciamento smallSeq foram gerados arquivos Fastq para cada amostra sequenciada e estes arquivos foram trimados para a remoção dos adaptadores utilizados por meio do *software cutadapt*. Em seguida o genoma de referência para *Bos Taurus* foi indexado pelo *software bowtie2* e as *reads* para cada miRNAs foram mapeadas a ele pelo uso da ferramenta *mapper.pl* disponibilizada pelo pacote *miRDeep2*. Após o mapeamento, tabelas contendo os miRNAs presentes em cada amostra e suas contagens foram geradas pelo *miRDeep2*.

4.6. Análise de expressão diferencial e correlação com resultados das PIVEs

Para a análise de expressão diferencial foram utilizados na seleção e normalização dos dados os *softwares* DESeq2 e edgeR.

Pelo pacote edgeR do bioconductor foram lidas as tabelas contendo as contagens para cada miRNA referente a cada amostra geradas no passo anterior. Cada amostra foi atribuída a um grupo e à uma condição de acordo com a comparação desejada, para analisar a influencia das taxas de clivagem e número de blastocistos em relação ao número de miRNAs contidos em cada uma. Em seguida foi realizada a normalização das bibliotecas de contagem para cada amostra por funções do próprio edgeR ou DESeq2, estabelecida uma amostra como referência, estimados os coeficientes de dispersão, realizados os testes estatísticos para cada par de amostras comparadas e filtrados os miRNAs com baixa contagem normalizada pelo *software* HTSFilter. Foi então verificada e expressão diferencial entre os dois grupos e aqueles miRNAs com valor de “p” estatístico ajustado menor que “0.05” (FDR < 0.05 edgeR e *padj-value* < 0.05 DESeq2), bem como valores de *logFoldChange* > 1 ou < -1 seriam considerados diferencialmente expressos entre as amostras comparadas para cada condição.

Os valores obtidos após seleção e normalização dos dados feitas pelos *softwares* DESeq e edgeR também foram utilizados para realizar o teste de correlação de Pearson entre a quantidade de cada microRNA e as taxas de clivagem e blastocisto das PIVEs realizadas com as mesmas amostras de sêmen utilizadas para a extração dos microRNAs. Apenas os miRNAs que apresentam correlação significativa ($p < 0,05$) após filtragem e seleção feitas em ambos *softwarese*, DESeq e edgeR, foram considerados como relevantes no presente estudo.

4.7. Produção *in vitro* de embriões

Foram realizadas 18 rotinas de PIVE de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia (LUCIO et al., 2016). Foi utilizado 2138 ovócitos nas PIVEs, sendo em média 267 ovócitos por touro.

4.7.1. Obtenção e seleção de ovócitos

Os ovários foram coletados a partir de fêmeas em um abatedouro comercial na cidade de Uberlândia e transportados em uma garrafa térmica com soro fisiológico a 37 °C até o momento da aspiração, cerca de 30 minutos após a coleta do último ovário. No momento da aspiração folicular, os ovários eram lavados em solução salina e mantidos em um banho maria a 37 °C durante todo o procedimento. Com o uso de seringas de 5 mL acopladas com agulhas de 18G, aspirou-se o fluido folicular oriundo dos folículos antrais, exceto os que visualmente eram classificados como possíveis folículos dominantes. Assim o fluido foi transferido para tubos *falcon* de 50 mL, onde passaram por um processo de sedimentação por cerca de 15 minutos. Em seguida, o sedimento foi depositado em placas de poliestireno de 90 x 15 mm e foi realizado o rastreamento de ovócitos de grau I (ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e com coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas e com várias camadas) e grau II (ooplasma com pequenas áreas não homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas com pelo menos mais de 5 camadas) com a ajuda de um microscópio estereoscópico (STOJKOVIC et al., 2001).

4.7.2. Maturação *in vitro* (MIV)

Os ovócitos de grau I e II selecionados, foram lavados em meio TCM – 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino) e uma vez em meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL FSH, 5 µg/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Foram transferidos 20 ovócitos por gota de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e foram mantidos por cerca de 22 h em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

4.7.3. Seleção espermática

A fim de selecionar os espermatozoides viáveis, uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos e foi depositada sobre um gradiente de Percoll, preparado previamente em um tubo Falcon de 15 mL, composto pela camada superior de Percoll 45% (500 µL de Percoll 90% e 500 µL de meio TALP-

Sperm (Tyrode-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina) e a camada inferior de 1 mL de Percoll 90% (Percoll, solução 10x, solução estoque 2mM CaCl₂, solução estoque 0,4 mM MgCl₂, 0,1 mM DL-ácido láctico e 20 mM bicarbonato de sódio).

4.7.4. Fertilização *in vitro* (FIV)

Os ovócitos maturados foram lavados três vezes em meio Fert-TALP e foram transferidos para gotas de 100 µL, do mesmo meio, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm. Gotas foram distribuídas aleatoriamente a fim de compor os grupos experimentais, touros férteis, subférteis e também o grupo de controle da FIV.

Do sedimento previamente separado, como descrito anteriormente, foram retiradas duas alíquotas de 5 µL para determinar a motilidade progressiva e a concentração em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 25 mil espermatozoides viáveis/µL e então 8 µL foram utilizados para fecundar cada gota, em seguida, foram incubados por 18 a 20 h em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, na temperatura de 38,5° e 100% de umidade.

4.7.5. Cultivo *in vitro*

Aproximadamente 24 horas após a fertilização *in vitro*, os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas e foram lavados por 3 vezes em gotas de 100µL de meio SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83 µg/mL de sulfato de amicacina) e transferidos para gotas de 100 µL do mesmo meio e cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm, onde foram cultivados por 6 dias em estufa, com atmosfera de 5% de CO₂, 100% de umidade e temperatura de 38,5°C.

A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a fertilização *in vitro* com a contagem dos zigotos que apresentavam duas ou mais células com o auxílio de microscópio estereoscópico.

A contagem dos blastocistos foi realizada no sétimo dia após a fecundação de acordo com as normas preconizadas pela “International EmbryoTransfer Society”. A taxa de blastocisto foi determinada em relação ao número de ovócitos que iniciaram a clivagem e chegaram a este estágio de desenvolvimento.

4.7.6. Normalização dos resultados das PIVEs

Como forma de neutralizar parcialmente os efeitos das variáveis não controláveis na PIVE, foi realizada a normalização dos dados obtidos nas PIVEs com sêmen de animais avaliados, tendo como referência os resultados obtidos com um touro fértil (touro referência), previamente testado em nossos laboratórios e com excelentes resultados. Para isso, as taxas de blastocistos das amostras de touros avaliados foram transformadas em porcentagem das taxas de blastocistos obtidas com o sêmen do touro referência, na mesma rotina de PIVE. Desta forma, os efeitos ambientais, da qualidade de ovócitos e outras variáveis desconhecidas foram minimizados.

5. RESULTADOS

As taxas de clivagem e de formação de blastocistos normalizadas, foram utilizadas para expressar os diferentes níveis de eficiência em PIVEs dos touros utilizados na produção *in vitro* de embriões, o que pode ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1: Médias e desvios-padrão das taxas de clivagem e de blastocistos normalizadas obtidas nas rotinas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) de touros com diferentes valores de eficiência.

Touro	Taxa de clivagem normalizada	Taxa de blastocisto normalizada
1	68,7±15,5	38,8±23,7
2	80,1±8,1	64,8±50,7
3	71,8±24,3	10,3±1,5
4	92,8±7,1	14,4±12,6
5	68,2±16	72,4±46,2
6	46,5±17,1	31,5±26,3

Fonte: autoria própria.

Ao todo, foram identificados 336 miRNAs no sequenciamento das seis amostras de ejaculados dos touros coletados, assim, esses foram transformados em percentagem para análise de correlação. A técnica utilizada para identificação e quantificação dos microRNAs não permitiu diferenciar o miR-11975 do miR-11976. Desta forma, a quantidade desses microRNAs é na realidade a somatória dos dois, sendo tratado a partir deste momento como miR-11975/miR-11976.

Não foram encontradas expressões diferenciais em nenhum dos microRNAs quando se comparou o grupo de amostras de sêmen que apresentaram boas taxas de clivagem (touros 2, 3 e 4) e de formação de blastocistos (touros 1, 2 e 5) com as amostras que apresentaram taxas ruins (touros 1, 5, e 6 para clivagem e touros 3, 4 e 6 para blastocistos).

O conteúdo de microRNA de todas as amostras foram correlacionadas com as taxas de clivagem e formação de blastocisto das rotinas de PIVE. Após o teste de correlação utilizando os dados selecionados e normalizados pelo *software* DESeq2, o

miR-124a e miR-125a foram identificados como tendo correlação negativa com a taxa de clivagem na produção *in vitro* de embriões (Tabela 2). Em relação a taxa de formação de blastocistos, foram encontradas correlação com quatro microRNAs, sendo negativa significativa com o miR-11972, miR-11975/miR-11976, miR-1246, miR-2285bf e positiva significativa com o miR-425-5p (Tabela 4).

Tabela 2: microRNAs espermáticos com correlação significativa ($p \leq 0,05$), negativa, com a taxa de clivagem na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Expressão diferencial selecionada e normalizada pelo software DESeq2.

miRNA	Valor de R	Valor de P
miR-124 ^a	-0,86	0,03
miR-125 ^a	-0,82	0,05

Fonte: autoria própria.

Tabela 3: microRNAs espermáticos com correlação significativa ($p \leq 0,05$), positiva ou negativa, com a taxa de formação de blastocistos na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Expressão diferencial selecionada e normalizada pelo *software* DESeq2.

miRNA	Valor de R	Valor de P
miR-11972	-0,85	0,03
miR-11975/miR-11976	-0,82	0,05
miR-425-3p	0,88	0,02
miR-425-5p	0,94	0,01

Fonte: autoria própria.

Em contrapartida, quando utilizados os dados filtrados e normalizados pelo *software* edgeR, nenhum microRNA apresentou correlação com a taxa de clivagem e cinco apresentaram correlação com a taxa de formação de blastocisto, sendo que o miR-11972, miR-11975/miR-11976, miR-1246 e miR-2285bf apresentaram correlação negativa significativa e o miR-425-5p apresentou correlação positiva significativa (Tabela 4).

Tabela 4: microRNAs espermáticos com correlação significativa ($p \leq 0,05$), positiva ou negativa, com a taxa de formação de blastocistos na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Expressão diferencial selecionada e normalizada pelo *software* edgeR.

miRNA	Valor de R	Valor de P
miR-11972	-0,92	0,008
miR-11975/miR-11976	-0,85	0,03
miR-1246	-0,91	0,01
miR-2285bf	-0,87	0,03
miR-425-5p	0,84	0,04

Fonte: autoria própria.

Por fim, apenas os microRNAs que correlações significativas quando usado os dois *softwares* (edgeR e DESeq2), tanto na taxa de clivagem quanto para a taxa de formação de blastocistos, foram validados no presente trabalho. Então, apenas o miR-425-5p foi associado positivamente e o miR-11972 e miR-11975/miR-11976 foram associados negativamente com a taxa de formação de blastocistos na produção *in vitro* de embriões.

6. DISCUSSÃO

Buscou-se com este estudo explorar a hipótese de que os microRNAs espermáticos estão associados aos processos de clivagem e formação de blastocistos em rotinas de produção *in vitro* de embriões. Inicialmente foi utilizada a estratégia de separar as amostras de sêmen em dois grupos, sendo um com boas taxas de clivagem e formação de blastocisto nas PIVEs e outro com taxas ruins para a análise de expressão diferencial. Assim, não foi encontrado diferenças significativas entre os

grupos quanto a expressão dos microRNAs. Isso provavelmente ocorreu porque os resultados obtidos nas PIVEs permitiram no máximo fazer um ranking das amostras, não sendo possível separar as amostras de forma clara e consistente em dois grupos com resultados bons e ruins. Baseado nesse evidente ranking dos resultados, optou-se por realizar testes estatísticos de correlação entre as taxas de clivagem e de formação de blastocistos e a quantidade normalizada de cada microRNA após a filtragem realizadas por dois consagrados *softwares* frequentemente utilizados para isso, o DESeq2 e o edgeR.

Com o uso dos *softwares* DESeq2 e edgeR, como algoritmo de filtragem e normalização de dados para realização dos testes de correlação, apenas com os dados oriundos do DESeq2 obteve-se correlação significativa de dois microRNAs (miR-124a e miR-125a) com a taxa de clivagem. Já com o uso do edgeR não se obteve correlação de microRNAs com a taxa de clivagem. Esse achado corrobora com o trabalho de Alvarez-Rodriguez e colaboradores (2020), que relata que no processo de espermiogênese acontece mudanças cruciais nas espermátides que envolvem RNAs não codificantes até se tornarem espermatozoides maduros. Assim, com o processo de maturação ao decorrer da passagem no epidídimo, a cromatina espermática fica altamente organizada e condensada pela protaminação (MARTINS et al., 2020), então não ocorre transcrição ou tradução alguma até a fase de fertilização, momento que antecede a descompactação da cromatina (GRUNEWALD et al., 2005) e que os microRNAs entram no citoplasma do ovócito e exercem sua função de controle pós-transcricional da expressão gênica. Então, é possível dizer que os microRNAs espermáticos só retornam sua atividade após a fecundação e portanto, as correlações encontradas quando utilizado o *software* DESeq2 é pouco consistente. Então, os miRNAs encontrados nas amostras de sêmen nesse trabalho, são resquícios de etapas do processo de espermatogênese e maturação espermática, pois foi descrito a importância dos miRNAs nesses processos (ROMERO et al., 2011; HOOG; LOTVALL, 2015 e DAI et al., 2019).

Através da análise bioinformática do transcriptoma de pequenos RNAs, foi possível identificar que o miR-425-5p apresentou correlação positiva com a taxa de formação de blastocistos nas rotinas de PIVE, em ambos os softwares utilizados. Anteriormente, essa molécula foi relatada com maior expressão em espermatozoides de cachorros com boa fertilidade (ALVAREZ-RODRIGUES, 2020). Além disso, esse

microRNA é conhecido na literatura como fator associado a oncogênese e foram encontrados como biomarcadores de mau prognóstico em câncer gástrico (ZHANG et al., 2017; FANG et al., 2017; YAN et al., 2017) e cervical (SUN et al., 2017). Pode se dizer que o processo de desenvolvimento embrionário possui algumas vias biológicas em comum com a formação de neoplasias. Como exemplo, temos a via de sinalização canônica Wnt/ β -catenina, no qual é um mecanismo fundamental na proliferação, polaridade e destino celular durante o desenvolvimento embrionário (WANG; SINHA; WYNshaw-BORIS, 2012), além de que, a desregulação dessa via pode levar a processos patológicos como o câncer (MACDONALD; TAMAI; XI, 2009).

Também foi relatado em casos de câncer de próstata que o miR-425-5p, possui como alvo de regulação gênica negativa, a proteína GSK3 β (LIU et al., 2019). Essa enzima impede o acúmulo intra-citoplasmático da proteína β -catenina na via Wnt, que regula a expressão de diversos genes do crescimento celular (ACEBRON et al., 2014). Então sugere-se que esse microRNA pode ter agido na regulação dessa importante via do desenvolvimento embrionário, através da inibição da produção de GSK3 β , desencadeando o início do processo de divisão e proliferação celular através do acúmulo da β -catenina. Isso justificaria o miR-425-5p presente em espermatozoides bovinos estar positivamente associado com a maior formação de blastocistos na produção *in vitro* de embriões.

Em contrapartida, nos resultados obtidos tanto no DESeq2 quanto no edgeR, alguns dos microRNAs (miR-11972 e miR-11975/miR-11976) apresentaram correlação negativa significativa com a taxa de blastocisto na PIVE. A literatura é extremamente escassa sobre esses microRNAs, necessitando-se de novas pesquisas para melhor compreensão de sua atuação no processo de desenvolvimento embrionário inicial. Entretanto, Morenikeji e colaboradores (2020) relataram que essas três moléculas estiveram associadas na regulação gênica da resposta inflamatória viral de bovinos através da atuação em genes alvos que também participam do desenvolvimento embrionário inicial, como o proto-oncogene C (SRC), no qual expressa uma tirosina quinase envolvida em tumores de alta malignidade e também na regulação da proliferação e migração celular (WHEELER; IIDA e DUNN, 2009). Além disso, esse gene foi descrito com papel na regulação do desenvolvimento embrionário e crescimento celular (PRUITT et al., 2008). Assim, por mais que o miR-11972 e miR-975/miR-11976 possuam esse importante alvo, são necessários mais

estudos transcriptômicos para afirmar com clareza os motivos pelos quais fizeram esses microRNAs espermáticos influenciarem negativamente a produção *in vitro* de embriões bovinos.

Mesmo o miRNA-425-3p (correlação positiva), miR-2285bf e miR-1246 (correlação negativa) apresentando correlação significativa em apenas um dos algoritmos de filtragem e normalização de dados e que foi estabelecido no presente estudo que apenas os microRNAs espermáticos identificados com correlação significativa em ambos *softwares*, DESeq2 e edgeR, seriam considerados como associados efetivamente à eficiência da produção *in vitro* de embriões. Portanto, esses microRNAs merecem maior atenção em pesquisas futuras *in vivo* e *in silico* para confirmar ou não essa correlação.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o miR-425 possui importantes papéis biológicos no desenvolvimento embrionário inicial, que levam a uma maior taxa de formação de blastocistos viáveis, assim, esse microRNA pode ser utilizado como marcador de touros com alta eficiência em PIVEs.

O miR-11972 e miR-11975/miR-11976 podem ser usados como marcadores de touros com baixa eficiência em PIVEs, pois interferem em processos biológicos importantes para o desenvolvimento embrionário inicial.

Portanto, esses microRNAs necessitam de atenção de estudos futuros como alvo de uma compreensão ainda maior de suas atividades no desenvolvimento embrionário, para que seja possível otimizar a técnica da produção *in vitro* de embriões, a qual é cada vez mais difundida no Brasil e no mundo.

REFERÊNCIAS

ACEPRON, S.P.; KARAUANOV, E.; BERGER, B.S.; HUANG, YL.; NIEHRS. Mitotic Wnt signaling promotes protein stabilization and regulates cell size. **Molecular Cell**, v. 54, n. 4, p.663-674, 2014. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.04.014.

AJONIJEBU, D.C.; ABOUSSSI, O.; RUSSEL, V.A.; MABANDLA, M.V.; DANIELS, W.M.U. Epigenetics: a link between addiction and social environment. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, p. 2735-2747, 2017. DOI: 10.1007/s00018-017-2493-1.

ALMIÑANA, C.; BAUERSACHS, S. Extracellular vesicles: Multi-signal messengers in the gametes/ embryo-oviduct cross-talk. **Theriogenology**, v.150, p.59-69, 2020. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.077.

ALMIÑANA, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; UZBEKOV, R.; SILVEIRA, J.C.; BAUESACHS, S.; MERMILLOD, P. Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. **BMC Genomics**, v. 19, n. 622, p.2-27, 2018. DOI: 10.1186/s12864-018-4982-5.

ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; MARTINEZ, C.; WRIGHT, D.; BARRANCO, I.; ROCA, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. The transcriptome of pig spermatozoa, and its role in fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1572, p.1-23, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051572.

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of PERCOLL® on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. **Theriogenology**, v. 44, p.871-xx878, 1995. DOI: 10.1016/0093-691x(95)00272-a.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, p.215-233, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.

BATTAGLIA, R.; PALINI, S.; VENTO, M.E.; FERLITA, A.L.; FARO, M.J.L.; CAROPPO, E.; BORZI, P.; FALZONE, L.; BARBAGALLO, D.; RAGUSA, M.; SACALIA, M.; D'AMATO, G.; SCOLLO, P.; MUSUMECI, P.; PURELLO, M.; GRAVOTTA, E.; DIPIETRO, D. Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid. **Scientific Report**, v. 9, n. 84, p.1-11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-36452-7.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p.92-96, 2013. Disponível em: www.cbra.org.br.

BREVIK, A.; LINDEMAN, B.; RUSNAKOVA, V.; OLSEN, AK.; BRUNBORG, G.; DUALE, N. Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo. **Toxicological Sciences**, v. 129, n. 1, p.157-165, 2012. DOI: 10.1093/toxsci/kfs187.

MARTINS, M.C.; GONÇALVES, L.M.; NONATO, A.; TRAVENÇOLO, B.A.N.; ALVES, B.A.; BELETTI, M.E. Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. **Theriogenology**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.004>.

CHUANG, J.C.; JONES, P.A. Epigenetics and MicroRNAs. **Pediatric Research**, v. 61, n. 5, p.24R-25R, 2007. DOI: 0031-3998/07/6105-0024R.

CONINE, C.C.; SUN, F.; SONG, L.; RIVERA-PÉREZ, J.A.; RANDO, O.J. Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in

mice. **Developmental Cell**, v. 46, p.470-480, 2018. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.06.024.

DADOUNE, JP. Spermatozoal RNAs: What about their functions? **Microscopy Research and Technique**, v. 72, p.536-551, 2009. DOI: 10.1002/jemt.20697.

DAI, DH.; QAZI, I.H.; RAN, MX.; LIANG, K.; ZHANG, Y.; ZHOU, GB.; ANGEL, C.; ZENG, CJ. Exploration of miRNA and mRNA profiles in fresh and frozen-thawed boar sperm by transcriptome and small RNA sequencing. **Molecular Sciences**, v.20, n. 4, p.1-19, 2019. DOI: doi.org/10.3390/ijms20040802.

EDDY, E.M. The spermatozoon. **Knobil and Neill's physiology of Reproduction**, v.1, p.3-54. New York, NY: Elsevier, 2006. DOI: 10.1007/978-1-62703-748-8_2.

FANG, F.; SONG, T.; ZHANG, T.; CUI, Y.; ZHANG, G.; XIONG, Q. MiR-425-5p promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells through SCAI-mediated dysregulation of multiple signaling pathways. **Oncotarget**, v.8, n. 19, p.31745-31757, 2017. Disponível em: www.impactjournals.com/oncotarget.

FERESHTEH, Z.; SCHMIDT, S.A.; AL-DOSSARY, A.A.; ACCERBI, M.; ARIGHI, C.; COWART, J.; SONG, J.L.; GREEN, P.G.; CHOI, K.; YOO, S. MARTIN-DELEON, P.A. Murine Oviductosomes (OVS) microRNA profiling during the estrous cycle: Delivery of OVSborne microRNAs to sperm where miR-34c-5p localizes at the centrosome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 16094, p.1-18, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-34409-4.

GARCIA, A.R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p.33-39, 2017. Disponível em: www.cbra.org.br.

GRUNEWALD, S.; PAASCH, U.; GLANDER, H.J.; ADEREGG, U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. **Andrologia**, v. 2, n. 3, p.69-71, 2005. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2005.00656.x.

HA, TY. MicroRNAs in human diseases: From cancer to cardiovascular disease. **Immune Network**, v. 11, n. 3, p.135-154, 2011. DOI: 10.4110/in.2011.11.3.135.

HAYASHI, K.; LOPES, S.M.C.S.; KANEDA, M.; TANG, F.; HAJKOVA, K.L.; LAO, K.; O'CARROLL, D.; DAS, P.P.; TARAKHOVSKY, A.; MISKA, E.A.; SURANI, M.A. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. **Plos One**, v. 3, n. 3, p.1-9, 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0001738.

HIRAIWA, S.H. **Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência na Produção *in vitro* de Embriões**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2015.

HOOG, J.; LOTVALL, J. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p.1-11, 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.28680.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature genetics supplement**, v. 33, p.245-254, 2003. DOI: 10.1038/ng1089.

JERCZYNSKI, O.; LACROIX-PÉPIN, N.; BOILARD, E.; CALVO, E.; BERNET, A.; FORTIER, M.A.; BJORKGREN, I.; SIPILA, P.; BELLEANNÉE. Role of Dicer1-

dependent factors in the paracrine regulation of epididymal gene expression. **Plos One**, v. 11, n. 10, p.1-26, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163876.

KASIMANICKAM, V.; BUHR, M.; KASIMANICKAM, R. Patterns of expression of sperm and seminal plasma microRNAs in boar semen. **Theriogenology**, v. 125, p.87-92, 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.10.021.

KIM, J.; LEE, J.; LEE, T.B.; JUN, J.H. Embryotrophic effects of extracellular vesicles derived from outgrowth embryos in pre- and peri-implantation embryonic development in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v.86, p.187-196, 2018. DOI: 10.1002/mrd.23093.

KOTAJA, N. MicroRNAs and spermatogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 6, p.1552-1562, 2014. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.025.

KROPP, J.; SALIH, S.M.; KHATIB, H. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. **Frontiers in Genetics**, v. 15, n. 91, p.1-8, 2014. DOI: 10.3389/fgene.2014.00091.

KUMAR, M.; KUMAR, K.; JAIN, S.; HASSAN, T.; DADA, R. Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. **Clinics**, v. 68, n. 51, p.5-14, 2013. DOI: 10.6061/clinics/2013(Sup01)02.

LEGRAND, J.M.D.; HOBBS, R.M. RNA processing in the male germline: Mechanisms and implications for fertility. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.79, p.80-91, 2018. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.10.006.

LI, Y.; LI, RH.; RAN, MX.; ZHANG, Y.; LIANG, K.; REN, YN.; HE, WC.; ZHANG, M; ZHOU, GB.; QAZI, IH.; ZENG, CJ. High throughput small RNA and transcriptome sequencing reveal capacitation-related microRNAs and mRNA in boar sperm. **BMC Genomics**, v. 19, n. 736, p.1-12, 2018. DOI: 10.1186/s12864-018-5132-9.

LIU, WM.; PANG, R.T.K.; CHIU, P.C.N.; WONG, B.P.C.; LAO, K.; LEE KF.; YEUNG, W.S.B. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p.490-494, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1110368109.

LIU, S.; WANG, Q.; LIU, Y.; XIA, ZY. miR-425-5p suppresses tumorigenesis and DDP resistance in human-prostate cancer by targeting GSK3b and inactivating the Wnt/b-catenin signaling pathway. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 102, p.1-11, 2019. DOI: 10.1007/s12038-019-9920-4.

LUCIO, A.C.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; MARTINS, M.C; BRAGA, L.S.; MIGILO, L.; ALVES, B.G.; SILVA, T.H.; BELETTI, M.E. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p.924-933, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.015.

MACDONALD, B.T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/b-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. **Developmental Cell**, v. 17, n. 1, p.9-26, 2009. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.

MELLO, C.C. Return to the RNAi World: Rethinking gene expression and evolution. **Angewandte Chemie**, v. 46, n. 37, p.6985-6994, 2007. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402252.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p.58-64, 2016. Disponível em: www.cbra.org.br.

MEYER, A.E.; PFEIFFER, A.C.; BROOKS, K.E.; SPATE, L.E.; BENNE, J.A.; CECIL, R.; SAMUEL, M.S.; MURPHY, C.N.; BEHURA, S.; MCLEAN, M.K.; CIERNIA, L.A.; SMITH, M.F.; WHITWORTH, K.M.; WELLS, K.D.; SPENCER, T.E.; PRATHER, R.S.; GEISERT, R.D. New perspective on conceptus estrogens in maternal recognition and pregnancy establishment in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 1, p.148-161, 2019. DOI: 10.1093/biolre/ioz058.

MORENIKEJI, O.B.; WALLACE, M.; STRUTTON, E.; BERNARD, K.; YIP, E.; THOMAS, B.N. Integrative network analysis of predicted miRNA-targets regulating expression of immune response genes in bovine coronavirus infection. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p.1-15, 2020. DOI: 10.3389/fgene.2020.584392.

NIXON, B.; STANGER, S.J.; MIHALAS, B.P.; REILLY, J.N.; ANDERSON, A.L.; TYAGI, S.; HOLT, J.E.; MCLAUGHLIN, E.A. The microRNA signature of mouse spermatozoa is substantially modified during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 4, p.1-20, 2015. DOI: 10.1095/biolreprod.115.132209.

OSTERMEIER, G.C.; DIX, D.J.; MILLER, D.; KHATRI, P.; KRAWETZ, S.A. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. **Mechanisms of Disease**, v. 360, p.772-777, 2002. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09899-9.

PRUITT, K.D.; TATUSOVA, T.; KLIMKE, W.; MAGLOTT, D.R. NCBI Reference sequences: Current status, policy and new initiatives. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p.d32-d36, 2008. DOI: 10.1093/nar/gkn721.

POHLER, K.G.; GREEN, J.A.; MOLEY, L.A.; GUNWARDENA, S.; HUNG, WT.; PAYTON, R.R.; HONG, X.; CHRISTENSON, L.K.; GEARY, T.W.; SMITH, M.F. Circulating microRNA as candidates for early embryonic viability in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, p.731-743, 2017. DOI: 10.1002/mrd.22856.

RAHMAN, M.S.; KWON, WS.; PANG, MG. Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, p.749-759, 2017. DOI: 10.1002/mrd.22810.

RAVAZI, S.M.; SABBAGHIAN, M.S.; JALILI, M.; DIVSALAR, A.; WOLKENHAUER, O.; SALEHZADEH-YAZDI, A. Comprehensive functional enrichment analysis of male infertility. **Scientific Reports**, v. 7, n. 15778, p.1-14, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-16005-0.

RENTHAL, W.; NESTLER, E.J. Chromatin regulation in drug addiction and depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p.257-268, 2009. DOI: 10.31887/DCNS.2009.11.3/wrenthal.

ROMERO, Y.; MEIKAR, O.; PAPAIOANNOU, M.D.; CONNE, B.; GREY, C.; WEIER, M.; PRALONG, F.; MASSY, B.; KAESSMANN, H.; VASSALI, JD, KOTAJA, N.; NEF, S. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. **Plos One**, v. 6, n. 10, p.1-11, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025241.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.D.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p.904-909, 2004. DOI: 10.1095/biolreprod64.3.904

SUH, MR.; LEE, Y.; KIM, J.Y.; KIM, SK.; MOON, SH.; LEE, J.Y.; CHA, KY.; CHUNG, H.M.; YOON, H.S.; MOON, S.Y.; KIM, V.N.; KIM, KS. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. **Developmental Biology**, v. 270, p.488-498, 2004. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.02.019.

SUN, L.; JIANG, R.; LI, J.; WANG, B.; CHUNHUA, M.; LV, Y.; MU, N. MicoRNA-425-5p is a potential prognostic biomarker for cervical cancer. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 54, n. 1, p.127-133, 2017. DOI: 10.1177/0004563216649377.

TUFEKCI, K.U.; MEUWISSEN, R.L.J.; GENÇ, S. The role of microRNAs in biological processes. **miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis**, v. 1107, Totowa, NJ: Humana Press, 2013. DOI: 10.1007/978-1-62703-748-8_2.

TURCHINOVICH, A.; WEIZ, L.; LANGHEINZ, A.; BURWINKEL, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 16, p.7223-7233, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr254.

VASHISHT, A.; GAHLAY, G.K. Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges. **Molecular Human Reproduction**, v. 26, n. 4, p.199-214, 2020. DOI: 10.1093/molehr/gaaa016.

WANG, J.; SINHA, T.; WYNHAW-BORIS, A. Wnt signaling in mammalian development: Lessons from mouse genetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, n. 5, p.1-16, 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a007963.

WELLER, D.L.; IIDA, M.; DUNN, E.F. The role of Src in solid tumors. **Clinical Pharmacology**, v. 14, p.667-678, 2009. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0009.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R.I.; DIEDERICH, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p.228-234, 2009. DOI: 10.1038/ncb0309-228.

YAN, Y.F.; GONG, F.M.; WANG, B.S.; ZHENG, W. MiR-425-5p promotes tumor progression via modulation of CYLD in gastric cancer. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.21, n. 9, p.2130-2136, 2017. PMID: 28537672.

YOUNG, R.A. Control of the embryonic stem cell state. **Cell**, v. 144, n. 6, p.940-954, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.01.032.

XU, H.; WANG, X.; WANG, Z.; LI, J.; XU, Z.; MIAO, M.; CHEN, G.; LEI, X.; WU, J.; SHI, H.; WANG, K.; ZHANG, T.; SUN, X. MicroRNA expression profile analysis in sperm reveals hsa-mir-191 as an auspicious omen of in vitro fertilization. **BMC Genomics**, v. 21, n. 165, p.1-9, 2020. DOI: 10.21203/rs.2.12439/v1.

ZHANG, Y.; HU, X.; MIAO, X.; ZHU, K.; CUI, S.; MENG, Q.; SUN, J.; WANG, T. MicroRNA-425-5p regulates chemoresistance in colorectal cancer cells via regulation of Programmed Cell Death 10. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 2, p.360-369, 2016. DOI: 10.1111/jcmm.12742.

ZHANG, Z.; WEN, M.; GUO, J.; SHI, J.; WANG, Z.; TAN, B.; ZHANG, G.; ZHENG, X.; ZHANG, A. Clinical value of miR-425-5p detection and its association with cell proliferation and apoptosis of gastric cancer. **Pathology – Research and Practice**, v. 213 n. 8, p.929-937, 2017. DOI: doi.org/10.1016/j.prp.2017.05.009.

ZHOU, Q.; XIE, F.; ZHOU, B.; LI, C.; KANG, Y., WU, B.; LI, L.; DAI, R. Fetal bovine serum-derived exosomes regulate the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in a cross-species manner. **Differentiation**, v. 115, p.11-21, 2020. DOI: 10.1016/j.diff.2020.06.004.