

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GABRIEL LUCAS ISTORINO DE SOUZA

MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS CORRELACIONADOS COM A FERTILIZAÇÃO E O
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES BOVINOS (*Bostaurus*) *IN VITRO*

UBERLÂNDIA

2019

GABRIEL LUCAS ISTORINO DE SOUZA

MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS CORRELACIONADOS COM A FERTILIZAÇÃO E O
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES BOVINOS (*Bostaurus*) *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2019

GABRIEL LUCAS ISTORINO DE SOUZA

MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS CORRELACIONADOS COM A FERTILIZAÇÃO E O
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES BOVINOS (*Bostaurus*) *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Área de Concentração: Biologia da reprodução.

Uberlândia, 18 de dezembro de 2019.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
(Orientador – UFU-MG)

Prof. Dr. Felipe Perecin
(Examinador – USP-SP externo)

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira
(Examinador – USP-SP externo)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729m Souza, Gabriel Lucas Istorino de, 1990-
2019 Micro-RNAs espermáticos correlacionados com a fertilização e o desenvolvimento inicial de embriões bovinos (*bostaurus*) *in vitro* [recurso eletrônico] / Gabriel Lucas Istorino de Souza. - 2019.

Orientador: Marcelo Emilio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.6025>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Citologia. I. Beletti, Marcelo Emilio, 1964-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 581

Rejane Maria da Silva (Bibliotecária) – CRB6/1925

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br

ATA DE DEFESA – PÓS GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico número 009/2019, do PPGBC				
Data:	18/12/2019	Hora de início:	13:45	Hora de encerramento:	17:10
Matrícula do Discente:	11712BCE001				
Nome do Discente:	Gabriel Lucas Istorino de Souza				
Título do Trabalho:	Micro-RNAs espermáticos relacionados à fertilização e ao desenvolvimento embrionário inicial in vitro de bovinos (<i>Bos taurus</i>)				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia da Reprodução				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Proteínas da cromatina, RNAs e genes de espermatozoides envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos				

Reuniu-se no Auditório do Bloco 4K, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Felipe Perecin – USP; Juliano Coelho da Silveira – USP e Marcelo Emílio Beletti orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Marcelo Emílio Beletti, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/12/2019, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Juliano Coelho da Silveira, Usuário Externo**, em 18/12/2019, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Felipe Percin, Usuário Externo**, em 18/12/2019, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1700015** e o código CRC **0CCCC333**.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer a Deus, que foi meu principal apoio durante todo este processo. Ao Professor Doutor Marcelo Emílio Beletti, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que me orientou neste trabalho e em todas as atividades que realizei durante o mestrado. Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado em Biologia Celular, especialmente a Isabella Cassimiro, Pedro Antônio Avila, Victor Pereira Muniz, Lays Oliveira Rocha e Luisa Miglio, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução, Muller, Lucas, Natália, Tamiris, Mariana, entre outros que foram sempre prestáveis e bons companheiros de trabalho, entre outros muitos amigos que, mesmo sem fazer parte da minha formação, me ajudaram indiretamente a ultrapassar este grande obstáculo.

Agradeço aos professores doutores membros da banca de defesa pela disposição em avaliarem o presente trabalho; ao LabGen na figura do Dr. Carlos Ueira Vieira pela parceria em experimentos; ao ICBIM por fornecer a estrutura dos laboratórios; à FAPEMIG por fomentar os recursos necessários à realização do trabalho e pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu ter dedicação exclusiva à pesquisa.

E por último, quero agradecer à minha família pelo apoio incondicional que me deram, especialmente aos meus pais e irmãos que acompanharam e acolheram cada dificuldade, frustração e conquista ao longo deste período.

*“Importante não é ver o que ninguém nunca viu,
mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A epigenética é definida como o estudo das alterações herdáveis na expressão gênica, sem que haja mudança na sequência primária de DNA. Os chamados “fatores epigenéticos” atuam na expressão gênica regulando características fenotípicas celulares. Os microRNAs (miRNAs) compreendem uma classe de fatores epigenéticos que são pequenas moléculas de RNAs endógenos incapazes de codificar proteínas e que atuam na regulação pré ou pós-transcricional da expressão gênica, degradando ou bloqueando os RNAs mensageiros. Todavia, ainda não compreendemos totalmente as funções destes RNAs transportados pelos espermatozoides no processo de fecundação e no desenvolvimento embrionário. O presente estudo teve como objetivo avaliar o conteúdo espermático de miRNAs em touros e correlacioná-lo com a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. Foram utilizadas amostras de sêmen de seis touros, as quais foram empregadas em rotinas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) e para avaliação semiquantitativa do conteúdo de miRNAs dos espermatozoides. Para identificar possíveis correlações entre o conteúdo de miRNA com a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial, foram realizados os testes de correlação de Pearson entre a quantidade porcentual de cada tipo de miRNA em cada amostra com as taxas de clivagem e as taxas de blastocisto obtidas nas PIVEs, respectivamente. Nenhum miRNA apresentou correlação significativa com a clivagem, porém, dentre os 336 tipos de miRNAs encontrados em pelo menos uma das amostras, o miRNA bta-miR-425-5p apresentou correlação positiva significativa com a taxa de blastocisto. Assim, este miRNA pode estar regulando direta ou indiretamente a expressão de genes importantes para o desenvolvimento inicial, ou, ser apenas resíduo de uma espermatogênese adequada. Este miRNA possui potencial como marcador molecular de fertilidade, já que o desenvolvimento embrionário adequado é essencial para se ter uma gestação a termo, ou seja, essencial para uma boa fertilidade. Os miRNAs bta-miR-1246, bta-miR-11975, bta-miR-2285bf, bta-miR-335 e bta-miR-7 apresentaram correlação negativa significativa com a taxa de blastocisto, o que pode ser interpretado como estes miRNAs estarem atuando direta ou indiretamente na expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, ou serem apenas resíduos da espermatogênese inadequada. De qualquer forma, possuem potencial como marcadores moleculares de problemas de fertilidade em touros.

Palavras-chave: microRNA. Desenvolvimento embrionário inicial. Espermatozoide.

ABSTRACT

Epigenetics is defined as the study of heritable alterations in gene expression without changing the primary DNA sequence. The so-called “epigenetic factors” act on gene expression by regulating cellular phenotypic characteristics. MicroRNAs (miRNAs) comprise a class of epigenetic factors that are small endogenous RNA molecules unable to encode proteins and that act in pre or post-transcriptional regulation of gene expression, degrading or blocking messenger RNAs. However, we do not yet fully understand the functions of these sperm RNAs in fertilization and embryonic development. The present study aimed to evaluate the sperm content of miRNAs in bulls and correlate it with the process of fertilization and early embryonic development. Semen samples from eight crossbred bulls (*Bos taurus x Bos indicus*) were used in *in vitro* embryo production (PIVE) routines and for semiquantitative evaluation of sperm miRNA content. To identify possible correlations between miRNA content with the fertilization process and early embryonic development, Pearson's correlation test was performed between the percentage amount of each miRNA type and the cleavage and blastocyst rates obtained in PIVEs, respectively. Among the 336 types of miRNAs found in at least one of the samples, MiRNA bta-miR-425-5p showed significant positive correlation with blastocyst rate. Thus, these miRNAs may be directly or indirectly regulating the expression of genes important for early development, or they may be just residues of proper spermatogenesis. In any case, these miRNAs have potential as molecular markers of fertility, as proper embryonic development is essential for term gestation, that is, essential for good fertility. Finally, miRNAs bta-miR-1246, bta-miR-11975, bta-miR-2285bf, bta-miR-335 and bta-miR-7 showed a significant negative correlation with blastocyst rate, which can be interpreted as miRNA acting directly or indirectly in the expression of genes important for early embryonic development, or just as residues of inadequate spermatogenesis. However, it has potential as a molecular marker of fertility problems in bulls.

Keywords: microRNA. Early embryonic development. Fertilization. Sperm.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Médias e desvios-padrão das taxas de clivagem e de blastocistos normalizadas obtidas nas PIVEs de touros de diferentes fertilidades.....15
- Tabela 2.** Micro-RNAs com correlação significativa ($p \leq 0,05$) positiva com taxa de blastocistos obtidas nas PIVEs.....16
- Tabela 3.** Micro-RNAs com correlação significativa ($p \leq 0,05$) negativa com taxa de blastocistos obtidas nas PIVEs.....16

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 – Espermatozoides.....	2
2.2 –Cromatina e Protaminação.....	3
2.3 – Espermatogênese.....	4
2.4 – Epigenética.....	6
2.5 – Transcriptoma.....	6
2.6 – microRNAs.....	7
2.7 – RNA-seq.....	8
2.8 – Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	9
3 – OBJETIVOS.....	10
3.1 – Objetivo Geral;.....	10
3.2 – Objetivos específicos.....	10
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 – Obtenção das amostras.....	10
4.2 – Seleção espermática e purificação das amostra.....	10
4.3 – Isolamento de miRNAs.....	11
4.4 – Sequenciamento de RNAs (RNA-seq).....	12
4.5 – Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	12
4.6 – Análise Estatística.....	14
5 – RESULTADOS.....	15

6 – DISCUSSÃO.....	18
7 – CONCLUSÃO.....	20
8 – REFERÊNCIAS.....	21
9 – ANEXOS.....	41

1.INTRODUÇÃO

A epigenética é definida como o estudo das alterações herdáveis na expressão gênica, sem que haja mudança na sequência primária de DNA (WOLFFE; GUSCHIN, 2000). Sendo assim, os chamados “fatores epigenéticos” atuam na expressão gênica regulando características fenotípicas celulares, possuindo também um profundo impacto nos processos de desenvolvimento dos organismos vivos (CARRELL, 2012). Além da biologia da reprodução e do desenvolvimento, o estudo da epigenética também possui grande relevância em diversas outras áreas da biologia e da medicina, incluindo biologia do câncer, estudo de efeitos ambientais e estudo do envelhecimento (HERCEG, 2011).

Os microRNAs (miRNAs) compreendem uma classe de fatores epigenéticos que são pequenas moléculas de RNAs endógenos compostos por aproximadamente 22 ribonucleotídeos incapazes de codificar proteínas e que atuam na regulação pré ou pós-transcricional da expressão gênica, degradando ou bloqueando os RNAs mensageiros (mRNAs). Para que isso funcione, o miRNA precisa apresentar complementariedade com a fita de mRNA, agindo exclusivamente em sua molécula alvo específica. (BARTEL, 2004; TAY et al., 2008). Uma grande diversidade de processos biológicos é regulada por miRNAs, entre eles diferenciação celular (TAY et al., 2008), apoptose (HE et al., 2010), angiogênese (NICOLI et al., 2010) e neurogênese (LIU & ZHAO, 2009; SMIRNOVA et al., 2005) que influenciam diretamente no desenvolvimento embrionário e fetal.

Os espermatozoides são únicos em sua morfologia e função. Historicamente, as células espermáticas eram vistas como meras cápsulas especializadas de transporte, cuja a única função era de carrear o material genético de encontro ao ovócito e, talvez, protege-lo durante percurso (CARRELL, 2012). Atualmente, já se sabe que os espermatozoides são altamente organizados e condutores metabolicamente funcionais do genoma masculino (BELETTI, 2013).

A cromatina nuclear dos espermatozoides é diferente de uma célula somática pois, durante a espermiogênese dos mamíferos, o material genético passa por um processo de compactação cromatínica onde as histonas advindas das células somáticas, que são proteínas básicas, são parcialmente substituídas por outras proteínas específicas de espermatozoides, chamadas protaminas ou proteínas queratinosas, as quais são ricas em arginina e cisteína oxidada o que as deixam com caráter básico (BLOCH, 1969). O arranjo obtido após a protaminação é uma estrutura toroidal extremamente compactada, que conseqüentemente

limita a transcrição e as sinalizações epigenéticas, já que o acesso ao DNA é impedido (JOHNSON et al., 2011).

De acordo com Kotaja (2014), o conteúdo nuclear espermático é composto também por vários tipos de RNAs não codificantes e os miRNAs desempenham funções importantes durante a espermatogênese. Todavia, ainda não compreendemos totalmente as funções destes RNAs transportados pelos espermatozoides na fecundação e no desenvolvimento embrionário (DADOUNE, 2009). Mas, acredita-se que o controle gênico e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário inicial, possam ser influenciados por estes (BELETTI, 2013).

Para entender as falhas e o sucesso reprodutivo na bovinocultura, assim como em qualquer outra espécie, é importante estudar, também, a fertilidade dos machos. Neste contexto, se aprofundarmos nosso conhecimento sobre a biologia molecular dos espermatozoides bovinos e aprimorarmos as biotecnologias na reprodução animal, — Além de ampliar nosso entendimento sobre o funcionamento básico da reprodução de maneira geral — será possível identificar biomarcadores de fertilidade que melhorem os processos de reprodução animal e conseqüentemente influenciem positivamente na atividade pecuária (SILVA 2018). Assim, o presente trabalho avaliou se os microRNAs espermáticos podem estar relacionados à fertilização e ao desenvolvimento embrionário inicial, *in vitro*, de bovinos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Espermatozoides

Na maioria das espécies de animais, existem apenas dois tipos de gametas, e eles são bem diferentes entre si. O ovócito está entre as maiores células do organismo, enquanto o espermatozoide é frequentemente o menor. Ambos os gametas são otimizados para propagação dos genes que eles carregam, mas só o espermatozoide possui capacidade própria de locomoção (ALBERTS, 2003). Os espermatozoides carregam metade do DNA de uma célula somática e por isso são considerados células haploides (FLESCH, GADELLA, 2000).

Historicamente, as células espermáticas eram vistas como meras cápsulas especializadas de transporte, cuja a única função era de carrear o material genético de encontro ao ovócito e, talvez, protege-lo durante o percurso (CARRELL, 2012). Atualmente, já se sabe que os espermatozoides são altamente organizados e condutores metabolicamente

funcionais do genoma masculino, o que faz deles únicos em sua estrutura e função (BELETTI, 2013).

Os espermatozoides possuem um formato alongado, dividido em cabeça, cauda e colo, que une as duas estruturas (FLESCH, GADELLA, 2000) e são naturalmente compostos por membrana plasmática, citoplasma e núcleo, mas com ausência de certas organelas

citoplasmáticas como ribossomos, retículo endoplasmático e aparato de Golgi que são desnecessárias para a tarefa de transporte do DNA até o ovócito (ALBERTS, 2003). O DNA fica protegido por um núcleo protuberante, localizado na cabeça, que ocupa grande parte da célula juntamente com um acrossoma, que é uma extensa vesícula localizada na região anterior da cabeça que armazena enzimas hidrolíticas, como hialuronidase e acrosina, necessárias na penetração da matriz extracelular do ovócito, também conhecida como zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994).

No centro da cauda está o axonema, estrutura formada por citoesqueleto, responsável pela motilidade do espermatozoide, constituído por nove microtúbulos duplos dispostos radialmente ao redor de dois microtúbulos simples centrais (MORTIMER, 2000). As mitocôndrias também se destacam nesta célula, pois são as organelas mais abundantes no citoplasma espermático e ficam posicionadas ao redor do axonema do flagelo - uma vigorosa estrutura que viabiliza seu deslocamento em meio fluido - onde realizam a fosforilação oxidativa a fim de produzir o ATP que dá a energia necessária para o movimento flagelar, possibilitando consequentemente a locomoção (LEITE, 2008).

Embora haja variações, o sêmen é muito similar entre todas as espécies existentes, sendo composto basicamente pelas células espermáticas e o plasma seminal. Porém, o perfil de seu conteúdo varia de indivíduo para indivíduo, dado a complexa combinação entre fatores ambientais, genéticos e fisiológicos que geram distinções em sua composição (BILLARD, 1986; RURANGWA et al., 2004). O plasma Seminal é composto por substâncias orgânicas e inorgânicas que são importantes nutrientes para o metabolismo espermático. Além disso, ele contribui para a quiescência das células, dando proteção contra os danos proteolíticos e oxidativos que possam danificar a integridade espermática (CIERESKO, 2008).

2.2- Cromatina e Protaminação

Diferente das células somáticas, a cromatina das células espermáticas apresenta uma estrutura extremamente condensada. O DNA de espermatozoides de camundongo, por exemplo, chega a ser seis vezes mais condensado do que de um cromossomo em mitose (WARD, 2011). Se compararmos o núcleo espermático com uma célula hepática, é possível

notar que quase todo o núcleo espermático é preenchido por DNA, enquanto na célula hepática ele preenche apenas parcialmente seu volume total (WARD & COFFEY, 1991).

A cromatina de células somáticas é constituída por ácidos nucleicos e proteínas que se encontram no interior do núcleo celular, sendo as histonas suas principais proteínas. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 ficam acopladas formando octâmeros, que juntamente com o DNA que circunda a estrutura, são chamados nucleossomos, que é onde o DNA se enovela e se mantém organizado (MENDITI et al., 2007; BLACK et al., 2011; BELETTI, 2013). Todavia, o núcleo espermático não comportaria todo esse volume da cromatina somática e nem mesmo a metade dele (WARD & COFFEY, 1991), o que faz com que, conseqüentemente, a cromatina espermática demande uma organização única, altamente condensada e compacta (SHARMA & AGARWAL, 2011).

No início da espermatogênese, processo que dá origem aos espermatozoides a partir de células diploides (espermatogônias), a cromatina é estruturalmente semelhante à das células somáticas, composta predominantemente por histonas (BALHORN, 2011). Durante o processo, as histonas vão sendo substituídas inicialmente por proteínas de transição, que é quando se observa o início da condensação cromatínica (OKO et al., 1996), depois essas proteínas de transição são trocadas por proteínas de carga positiva, chamadas protaminas que compactam a cromatina formando estruturas denominadas toroides (BALHORN, 2011). O arranjo obtido após a protaminação é uma estrutura toroidal extremamente compactada, que conseqüentemente limita a transcrição e as sinalizações epigenéticas, já que o acesso ao DNA é impedido nessas regiões (JOHNSON et al., 2011).

As protaminas são ricas em argininas, aminoácidos carregados positivamente, que por sua vez, neutralizam os grupos fosfato negativamente carregados no DNA, fazendo com que não haja repulsão entre partes da fita de DNA, facilitando a organização lado a lado em um arranjo linear, como uma estrutura lamelar, otimizando a compactação em um volume extremamente reduzido. (BALHORN, 1982). Esta estratégia de protaminação protege a cromatina e garante a integridade do genoma paterno durante a passagem pelo trato masculino e feminino (OLIVA, 2006; SHARMA & AGARWAL, 2011), além de conferir uma morfologia mais hidrodinâmica para célula, otimizando sua motilidade até o ovócito (BALHORN, 2011).

2.3- Espermatogênese

A produção do gameta masculino, chamada espermatogênese, se dá por um complexo processo de diferenciações e divisões celulares, capaz de produzir células altamente

especializadas chamadas espermatozoides (HESS & FRANÇA, 2008). Quando o macho inicia a puberdade, dá-se início a este processo, que passa a produzir espermatozoides continuamente, independente da frequência de ejaculações, cessando sua produção apenas com a chegada da senescência reprodutiva (GARCIA, 2017)

Todo o processo da espermatogênese ocorre no epitélio seminífero, dentro dos túbulos seminíferos que ficam localizados nos testículos. Este processo se inicia quando células menos diferenciadas, chamadas espermatogônias, que ficam dispostas na região basal do túbulo, vão gradualmente migrando do compartimento basal para o adluminal, atravessando por entre o espaço intercelular das células de Sertoli adjacentes, e transpondo a barreira hemato-testicular até a espermição na luz do túbulo seminífero (MRUK; CHENG, 2004).

As células germinativas (espermatogônias, espermatócitos primário, secundário e espermátides), das quais os espermatozoides provém, são únicas em sua capacidade de gerar novos organismos, e por isso os eventos moleculares que atuam sobre elas, ao longo do processo, precisam ser rigorosamente regulados para que haja a transmissão correta do material genético e epigenético para as gerações seguintes (BANKS, 1992; SHARPE, 2012).

A espermatogênese pode ser dividida em duas fases distintas: a espermatocitogênese e a espermiogênese. Na espermatocitogênese ocorre formação das espermátides a partir de espermatogônias, enquanto na espermiogênese as espermátides se diferenciam em espermatozoides (GARCIA, 2017). Todo este processo que ocorre nos túbulos seminíferos dura em torno de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos estudados (FRANÇA; RUSSELL, 1998; JOHNSON, 1991). Em touros, só o processo de espermatocitogênese divisional, desde espermatogônia até espermátide, leva aproximadamente 45 dias (GARNER; HAFEZ, 2004).

De uma forma mais detalhada, a espermatocitogênese começa com divisões mitóticas das espermatogônias A1, resultando em células filhas mais diferenciadas, chamadas espermatogônias A2, A3, Intermediárias, B1 e B2. E estas, por sua vez, iniciam a meiose, dando origem a espermatócitos primários, que após a primeira divisão da meiose dão origem a dois espermatócitos secundários cada, que seguidamente passam pela segunda divisão da meiose dando origem a quatro espermátides (AMAN; SCHANBACHER, 1983).

Na espermiogênese, as espermátides se diferenciam em espermatozoides (AMAN; SCHANBACHER, 1983). Por serem células haploides, não ocorre mais divisão celular neste estágio, onde as espermátides apenas passam por um conjunto de modificações estruturais. Durante esta diferenciação, ocorre a condensação gradual da cromatina reduzindo-se o volume ocupado no núcleo das espermátides (JOHANISSON et al., 2000). Neste momento, as células adquirem uma forma alongada, fragmentos de citoplasma excedente são eliminados,

fazendo com que o núcleo pareça mais protuberante, o acrossoma fica sobreposto à cabeça e a célula adquire um flagelo bem desenvolvido, ancorado à uma peça intermediária, ricamente circundada por mitocôndrias (GARCIA, 2004).

2.4- Epigenética

A epigenética é definida como o estudo das alterações herdáveis na expressão gênica, sem que haja mudança na sequência primária de DNA (WOLFFE; GUSCHIN, 2000). Sendo assim, os chamados “fatores epigenéticos” atuam na expressão gênica regulando características fenotípicas celulares, possuindo também um profundo impacto nos processos de desenvolvimento dos organismos vivos (CARRELL, 2012). Além da biologia da reprodução e do desenvolvimento, o estudo da epigenética também possui grande relevância em diversas outras áreas da biologia e da medicina, incluindo biologia do câncer, estudo de efeitos ambientais e estudo do envelhecimento (HERCEG, 2011).

Uma série de mecanismos epigenéticos atuam sobre o genoma regulando a expressão gênica através de modificações químicas, tais como acetilações e metilações do DNA, modificação das histonas e sinalizações de RNAs não-codificantes (ncRNAs). Esses processos não alteram a sequência de bases do DNA genômico mas resultam em mudanças fenotípicas precisas. Essas modificações são constantemente feitas e desfeitas durante toda a vida do indivíduo, podendo ser influenciadas por diversos fatores, como estímulos ambientais, dietas, exposição a substâncias nocivas, entre outros (COSTA; PACHECO, 2013).

Por um bom tempo, os espermatozoides foram considerados meros vetores de carreamento do genoma paterno até o ovócito. Entretanto, a influência dos espermatozoides nos embriões recentemente vem sendo melhor elucidada, graças a novas evidências que sugerem que diversos componentes espermáticos participam ativamente no desenvolvimento embrionário inicial, incluindo fatores epigenéticos (BARROSO et. Al.,2009 & KRAWETZ, 2005). Durante a fertilização, o espermatozoide transmite não somente o DNA nuclear mas também o Fator de Ativação do Ovócito (OAF) (crucial na fertilização), centrossomos (importante para divisão celular) (SUTOVKY & SHATTEN,2000), a população de RNAs mensageiros (mRNA) e RNAs não-codificantes que são indispensáveis no desenvolvimento embrionário (OSTERMEIER, 2005).

2.5- Transcriptoma

O transcriptoma é a compilação completa dos transcritos (RNAs) de uma célula, em um momento específico de seu desenvolvimento ou condição fisiológica. Revelar os

constituintes moleculares das células e tecidos possibilita interpretar os elementos funcionais do genoma e, conseqüentemente, facilita a identificação de mecanismos moleculares de adaptação e desenvolvimento das células. As análises transcricionais buscam principalmente catalogar todas as espécies de transcritos, incluindo mRNAs e outros RNAs não codificantes; determinar a estrutura transcrita dos genes, em termos de sítios de iniciação, “5’ e 3’ ends”; e determinar *splicing* alternativo e outras modificações pós-transcricionais. A análise do transcriptoma também permite quantificar as mudanças nos níveis de expressão de cada transcrito em determinadas condições (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

2.6- Micro-RNAs

Os microRNAs (miRNAs) compreendem uma classe de fatores epigenéticos que são pequenas moléculas de RNAs endógenos compostos por aproximadamente 22 ribonucleotídeos incapazes de codificar proteínas e que atuam na regulação pré ou pós-transcricional da expressão gênica, degradando ou bloqueando os RNAs mensageiros (mRNAs). Para que isso funcione, o miRNA precisa apresentar complementariedade com a fita de mRNA, agindo exclusivamente em sua molécula alvo específica. (BARTEL, 2004; TAY et al., 2008). Uma grande diversidade de processos biológicos é regulada por miRNAs, entre eles, diferenciação celular (TAY et al., 2008), apoptose (HE et al., 2010), angiogênese (NICOLI et al., 2010) e neurogênese (LIU & ZHAO, 2009; SMIRNOVA et al., 2005), sendo que, todos esses processos influenciam diretamente no desenvolvimento embrionário e fetal.

A produção dos miRNAs começa no núcleo das células, onde a enzima RNA polimerase II transcreve sua forma precursora, chamada miRNA primário (pri-miRNA). A pri-miRNA, muda sua conformação para um *hairpin* que é clivado posteriormente por uma RNase III (Drosha). Após esta clivagem temos uma molécula de pré-miRNA que possui o tamanho de 70 nucleotídeos. Esse pré-miRNA é então exportado para o citoplasma através da exportina 5 e lá é processado pela enzima Dicer, onde o mesmo é transformado, através de uma nova clivagem, em um miRNA/miRNA* duplex com aproximadamente 20 pb (GERLACH; VAIDYA, 2017; O'CONNELL et al., 2010). Em continuidade com este processo, em seguida, uma proteína chamada AGO 2 separa a molécula em duas fitas independentes e se mantém unida a uma das partes. Na molécula mi-RNA duplex, apenas uma das fitas é o miRNA maduro que se juntará ao Complexo Silenciador Induzido por RNA (RISC) enquanto a outra fita é geralmente degradada. Uma vez montando este complexo, o miRNA se direciona ao mRNA alvo, e pareia-se com o mesmo reprimindo a tradução proteica, ou induzindo a sua degradação. O complexo RISC é composto por proteínas

argonautas (AGO) e proteína glicina-triptofano de 182kDa (GW182) que são moléculas indispensáveis no silenciamento, consideradas chave na montagem e funcionamento do complexo (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; WINTER, 2009).

Além de regular mRNAs dentro de suas células de origem, os miRNAs podem regular genes dentro de outras células alvos, sendo carregados em exossomos a fim de mediar interações célula-célula (CHEN et al., 2012). Exossomos são vesículas medindo de 40-100 nm que se formam a partir de endossomos no interior das células secretoras. Essas vesículas contendo miRNAs são incorporadas por outras células através de fusão de membranas, fagocitose ou endocitose (VISHNOI; RANI, 2017). A transferência exossomal é funcional e sua influência no comportamento da célula receptora vem sendo amplamente demonstrada em estudos recentes (BOBRIE et al., 2011; MITTELBRUNN et al., 2011; ROCCARO et al., 2013).

Apesar de os espermatozoides não possuírem atividade transcricional, eles são ricos em miRNAs com capacidade de regulação epigenética (Rodgers et al., 2013). Portanto, conhecer melhor estes miRNAs espermático nos ajuda a compreender melhor a reprodução animal como um todo (FAGERLIND et al., 2015). Ao traçar o perfil de miRNAs, podemos analisar as informações epigenéticas que estão sendo transmitidas ao embrião, possibilitando inferir sobre em quais processos exatos estes RNAs são necessários ou dispensáveis. Sendo assim, pode-se aferir a fertilidade espermática usando os miRNAs como biomarcadores de atuação sobre o desenvolvimento embrionário inicial e o desenvolvimento fetal (GOVINDARAJU et al., 2012) além de atribuir aos indivíduos diferentes graus de fertilidade.

2.7- RNA-seq

O sequenciamento de RNAs (RNA-Seq) utiliza tecnologia de sequenciamento de 2ª geração para traçar o perfil do conteúdo transcriptômico. Este método se mostra mais eficaz do que abordagens baseadas na hibridação como o “microarray”. O RNA-Seq não se limita à detecção de transcritos correspondentes à sequência genômica presente nas sondas e, além disso, pode apresentar variações de sequência (por exemplo, os SNPs) nas regiões transcritas. O RNA-Seq consegue, em uma única corrida, gerar milhões de fragmentos de sequências curtas de RNAs (WANG et al., 2009).

Primeiramente a amostra de RNA é convertida em uma biblioteca de cDNA. Depois os fragmentos de cDNA se ligam a adaptadores e uma curta sequência é gerada a partir de cada cDNA que, utilizando tecnologia de sequenciamento de alto rendimento, gera sequências

curtas. Estes novos fragmentos (chamados de reads) são correlacionados com o genoma ou transcriptoma referencial, onde serão utilizados no cálculo dos níveis de expressão e também na identificação de splicing alternativo (TRAPNELL et al., 2009). Dessa forma, o RNA-Seq é ideal para análises quantitativas de níveis de expressão de transcritos. A maior parte dos estudos de RNA-Seq publicados até o momento, vem abordando esta questão, e é notável que os dados obtidos por esta tecnologia, por serem altamente quantitativos, proporcionam medições confiáveis dos níveis de transcritos em diversas condições. Sua elevada sensibilidade permite a distinção da expressão de transcritos de mais de um tipo celular específico (MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

2.8- Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma importante tecnologia de reprodução assistida que permite formar um indivíduo fora do trato reprodutivo natural da fêmea, onde é possível, em laboratório, unir espermatozoide e ovócito gerando um embrião viável. Este processo demanda as etapas de coleta dos ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (Gonçalves et al., 2008).

É sabido que espermatozoides têm um papel tão importante quanto o ovócito, contribuindo, não só com aspectos genéticos, mas também com elementos fundamentais para fecundação e o desenvolvimento embrionário (OSTERMEIER et al., 2004; BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007; KROPP et al., 2017). Estudos em reprodução de bovinos demonstraram correlações positivas entre a fertilidade a campo (*in vivo*) e a fertilidade *in vitro*, sendo esta, definida por taxa de fecundação, clivagem e blastocisto (ZHANG et al., 1997; DANILENKO et al., 1999; WARD et al., 2001, 2003).

Ao analisar as taxas de blastocistos produzidos a partir de ejaculados de touros diferentes, ou até mesmo de ejaculados diferentes de um mesmo touro, nota-se variações que podem sugerir diferenças na qualidade espermática das amostras (HUNTER; DEMMENT; MILLER, 1987; PALMA; SINOWATZ, 2004; ALOMAR et al., 2006; CASTRO et al., 2018b). Desta forma, a PIVE se mostra uma importante e eficaz ferramenta de avaliação da qualidade espermática.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral:

Objetivou-se com este estudo identificar microRNAs presentes em espermatozoides de bovinos e associá-los à fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, identificando possíveis marcadores de fertilidade.

3.2- Objetivos específicos:

- 1- Identificar e caracterizar os miRNAs encontrado em espermatozoides bovinos.
- 2- Correlacionar o conteúdo de miRNAs com as taxas de Fertilização *in vitro* (FIV)
- 3- Correlacionar o conteúdo de miRNAs com as taxas de Blastocistos obtidos *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Obtenção das amostras

Seis amostras de sêmen foram obtidas através do processo de eletroejaculação realizado em cinco touros Girolando oriundos da fazenda Capim Branco da Universidade Federal de Uberlândia e em três touros Guzerá oriundos da Fazenda Experimental da Universidade de Uberaba. Posteriormente, as seis amostras foram diluídas em meio TRIS-gema-glicerol (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, 6,5% (v/v) de glicerol, em água destilada, pH 7.4). As amostras foram padronizadas a uma concentração de 80 milhões de espermatozoides moveis por mL de meio Tris-gema-glicerol e posteriormente envasadas em palhetas de 0,5 mL. Estas foram congeladas automaticamente no equipamento da TK (Uberaba, MG, Brasil) modelo 3000 Compacta, utilizando-se a curva de congelamento P2S1. Depois disso, as palhetas foram armazenadas a -196°C em nitrogênio líquido.

4.2- Seleção espermática e purificação das amostras.

A fim de purificar as amostras de contaminantes como, células somáticas advindas do trato reprodutivo, espermatozoides anormais, o plasma seminal e o diluente crioprotetor, as

amostras de sêmen foram submetidas a um processo de seleção espermática por gradiente de *Percoll* (AVERY & GREVE, 1995).

Para a purificação dos espermatozoides com o *Percoll*, o conteúdo de cada amostra armazenado em palhetas criopreservadas foi descongelado em banho maria a 37°C por 40 segundos e depositado sobre um gradiente descontínuo de *Percoll* (45-90% em meio Sperm-Talp, um mL de cada concentração, previamente estabilizado em estufa à 38,5 °C e com atmosfera de 5% de CO₂, por 02 horas), preparado em tubo de fundo cônico de 15 mL. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1400 g por 30 min., fazendo com que se formasse, no fundo do tubo, um pellet de espermatozoides. Para retirada do *Percoll*, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 0,5 mL de PBS e novamente centrifugado a 1400 g por 20 minutos, sendo o sobrenadante novamente centrifugado. Essa etapa foi repetida duas vezes.

4.3- Isolamento de miRNAs

Para o isolamento dos miRNAs foi utilizado o kit *mirVana™ miRNAisolation* (Invitrogen) (cat. num: AM1560) para a extração de RNAs. Este kit foi desenvolvido para extrações de RNAs de amostras celulares em cultura ou tecido. A extração dos miRNAs foi feita com a ressuspensão do pellet obtido na seleção espermática, em 300 µL de *lysis/bindingsolution*. O tubo foi agitado em vórtex por 1 min. para obter um lisado homogêneo. Em seguida, foi adicionado o volume de 30 µL de *miRNAHomogenateAdditive* e posteriormente vortexado por 1 min. e a mistura foi deixada no gelo por 10 min. Foi adicionado 300 µL de Ácido-Fenol Clorofórmio e agitado no vórtex por 2min, o lisado foi então centrifugado a 10000 g por 5 min em temperatura ambiente. Depois a fase aquosa sobrenadante foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 470 µL de etanol 100%. Em seguida a mistura foi pipetada e colocada dentro de um novo tubo contendo um filtro de sílica, este novo tubo foi centrifugado a 10000 g por 15 seg. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda a mistura de lisado e etanol fosse filtrada. Foram adicionados 500 µL de *miRNAWashSolution 1* sobre o tubo com o filtro e ele foi centrifugado por 10 seg a 10000 g. O líquido foi descartado e 500 µL de *miRNAWashSolution 2/3* foram aplicados à coluna e centrifugados 10 seg a 10000 g. O RNA foi eluído com 100 µL de *elutionsolution* a 100°C e os RNAs foram colocados em tubos estabilizadores de RNA (RNA stable® / LD) (Biomatrix catalog #90221-001) e deixados *overnight* em câmara de vácuo para secar.

Após a secagem completa de cada amostra nos tubos de RNASTable, os mesmos foram selados e armazenados em câmara de vácuo à temperatura ambiente a fim de se manter a baixa humidade, que pode danificar as amostras, até serem enviados para o 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 *Bostaurus* (urlgenome).

Para a análise dos pequenos RNAs, apenas reads de comprimento compreendido entre 15 e 35 nucleotídeos foram selecionados; 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- Produção *in vitro* de embriões

Foram realizadas 18 rotinas de produção *in vitro* de embriões de acordo com o protocolo do laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia (LUCIO et al., 2016). Utilizou-se um total de 2138 ovócitos nas PIVEs, sendo em média 267 ovócitos por touro.

Obtenção e seleção de ovócitos

Ovários foram coletados no Frigorífico Luciana, na cidade de Uberlândia, e transportados para o laboratório em solução fisiológica a 30-33°C. A aspiração dos folículos

antrais de 3 a 8 mm foi feita com agulha de 19-g acoplada a uma seringa de 10 mL. O fluido folicular obtido foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e, após 15 minutos, o sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 90 x 15 mm e avaliado sob microscópio estereoscópico para a realização do rastreamento dos ovócitos. Os ovócitos obtidos no rastreamento foram classificados e foram selecionados apenas ovócitos de graus 1 e 2 (STOJKOVIC et al., 2001) para o experimento, ou seja, os que apresentaram no mínimo quatro camadas de células do cumulus e citoplasma de colocação uniforme. Os ovócitos não selecionados, considerados atrésicos e desnudos, foram descartados.

Maturação in vitro (MIV)

Ovócitos selecionados foram lavados uma vez 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.

Seleção espermática

Uma dose de sêmen foi descongelada por 30 s em banho maria a 36°C e depositada em um tubo cônico de 15 mL contendo 2 mL de meio Sperm-TALP (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina). Após homogeneização e centrifugação por 5 min a 260 x g, o sobrenadante foi descartado e então foi realizada a segunda centrifugação nas mesmas condições que a primeira. Foram transferidos 30 µL do sedimento formado para um microtubo contendo 30 µL de meio Fert-TALP.

Fecundação 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 CO_2 em ar, na temperatura de $38,5^\circ$ e 100% de umidade. A contagem da clivagem foi realizada 48 horas após a FIV.

Cultivo in vitro (CIV)

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 100 μL de meio SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83 $\mu\text{g/mL}$ Lamicacina) 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 CO_2 , 100% de umidade e temperatura de $38,5^\circ\text{C}$.

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

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

4.6- Análise Estatística

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.

Uma normalização dos resultados da análise dos miRNAs também foi realizada a fim de se obter um número representativo da quantidade de cada miRNA por amostra. Para tanto, o número de reads de cada miRNA foi transformado em porcentagem em relação ao número

total de reads encontrado na amostra. Para a identificação de possíveis influências da quantidade de cada miRNA identificada sobre os processos de desenvolvimento embrionário inicial in vitro, foi calculada a correlação entre essa porcentagem de blastocistos obtidos nas PIVEs e a quantidade de cada miRNA em cada amostra. Foram consideradas correlações significativas quando $p \leq 0,05$ e quando o miRNA foi encontrado em todas as seis amostras de sêmen.

5. RESULTADOS

As taxas de clivagem e de blastocistos normalizadas obtidas nas PIVEs estão representadas na tabela 1, demonstrando os diferentes níveis de fertilidade dos touros.

Tabela 1: médias e desvios-padrão das taxas de clivagem e de blastocistos normalizadas obtidas nas PIVEs de touros de diferentes fertilidades

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±71,	14,4±12,6
5	68,2±16,	72,4±46,2
6	46,5±17,1	31,5±26,3

Foram avaliadas, através do RNA-seq, seis amostras de sêmen bovino identificando-se 336miRNAs. Estes, estão representados no anexo I. Para a análise de correlação, os dados do sequenciamento foram transformadas em porcentagem e seus resultados estão representados no anexo II.

Os resultados de miRNAs obtidos no sequenciamento e encontrados em todas as amostras foram correlacionados com as taxas de clivagem e blastocistos formados nas PIVEs. Após o teste de correlação de Pearson, dos 336microRNAs obtidos, nenhum miRNA teve correlação negativa ou positiva com a taxa de clivagem.

Das análises de correlação entre miRNAs e a taxa de blastocistos formadas nas PIVEs, apenas seis apresentaram correlação significativa, sendo um com correlação positiva e cinco,

negativa (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Micro-RNAs com correlação significativa ($p \leq 0,05$) positiva com taxa de blastocistos nas PIVEs.

Mirna	Coefficiente de correlação	P
bta-miR-425-5p	0,84	0,03

Tabela 3. Micro-RNAs com correlação significativa ($p \leq 0,05$) negativa com taxa de blastocistos nas PIVEs.

Mirna	Coefficiente de correlação	P
bta-miR-1246	-0,92	0,01
bta-miR-11975 e 11976	-0,81	0,05
bta-miR-2285bf	-0,82	0,04
bta- miR-335	-0,82	0,04
bta-miR-7	-0,82	0,04

Gráfico 1. Dispersão do miRNA que apresentou correlação significativa ($p \leq 0,05$) positiva com a taxa de blastocistos obtida nas PIVEs.

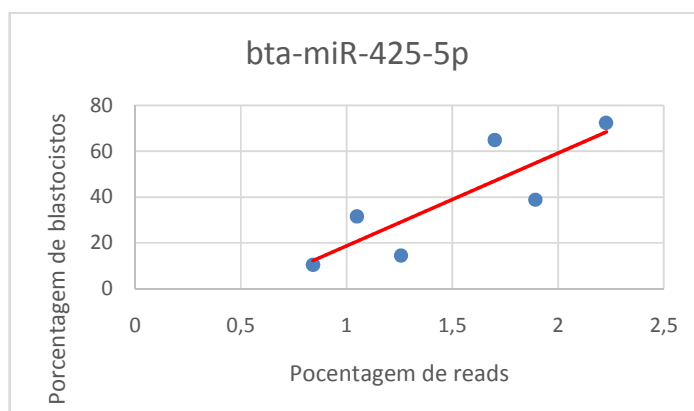
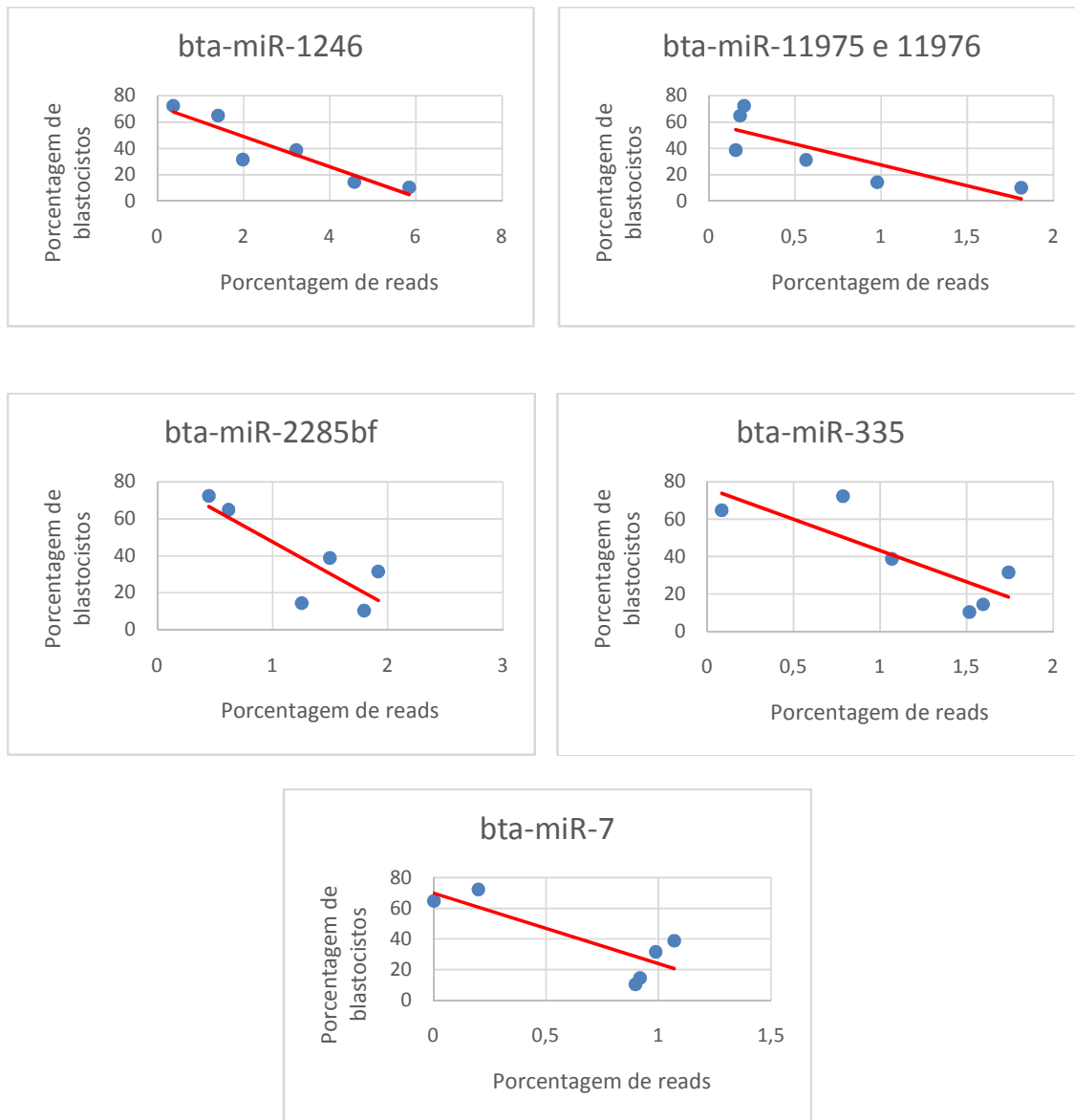


Gráfico 2. Dispersão do miRNA que apresentou correlação significativa ($p \leq 0,05$) negativa com a taxa de blastocistos obtida nas PIVEs.



6.DIUSSÃO

No presente estudo, levantou-se a hipótese de que, as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, podem estar associadas direta ou indiretamente com o conteúdo de miRNAs de espermatozoides bovinos. Com o teste de correlação de Pearson entre as porcentagens de diferentes miRNAs encontradas em amostras de sêmen e as taxas de clivagem e blastocistos obtidas em PIVES, foi demonstrado, que nenhum miRNA apresenta correlação significativa com a clivagem, o que pode sugerir que o conteúdo de miRNAs não tem influência direta no processo de fecundação dos espermatozoides durante a FIV, uma vez que o processo de fecundação não demanda sinalizações epigenéticas para se efetivar. Já as taxas de blastocistos obtidas nas PIVES, apresentaram correlação significativa com 6 miRNAs espermáticos, sendo que o bta-miR-425-5p apresentou correlação positiva indicando que sua presença afeta o sucesso na formação de blastocistos, enquanto os miRNAs bta-miR-1246, bta-miR-11975, bta-miR-2285bf, bta-miR-335 e bta-miR-7 apresentaram correlação negativa significativa com a taxa de blastocisto, o que pode ser interpretado como estes miRNAs estarem atuando direta ou indiretamente na expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário inicial.

Apesar de poucos dados a respeito do miR-425-5p, sabe-se que este miRNA atua como um supressor de tumor e suprime a proliferação e migração celular (CRISTOBAL et al., 2016; ZHANG et al., 2016) que são processos biológicos de extrema importância no desenvolvimento do embrião. Em 2020 Yuan e colaboradores demonstraram que a super-expressão de miR-425-5p induz a apoptose celular evidenciando o importante caráter regulador de proliferação celular deste miRNA. O presente estudo apresentou correlação positiva significativa entre o miR-425-5p e a taxa de blastocistos formada, o que sugere alguma influência do miR-425-5P na embriogênese bovina.

O miRNA mais abundante descrito em espermatozoides humanos é o miR-1246. Atualmente pouco se sabe sobre a função e evolução do miR-1246, mas se sabe que ele foi descoberto pela primeira vez em células-tronco embrionárias humanas (MORIN et al., 2008). Usando ferramentas de previsão de genes, miRNA e genômica comparativa, descobriu-se que o miR-1246 provavelmente evoluiu de uma linhagem de primatas (PANTANO, 2015).

Ainda pouco se sabe sobre os alvos do miR-1246. O único alvo experimentalmente confirmado de miR-1246 é a proteína quinase 1A associada à síndrome de Down (DYRK1A) (ZHANG et al., 2011). Um estudo com tecidos que apresentam expressão estatisticamente significativas de genes-alvo do miR-1246 previstos, identificou os testículos como região mais abundante desta molécula. Além disso, outros genes que são previstos como alvos mais

específicos do miR-1246 incluem vários genes específicos dos testículos como a gametogenina (GGN), que é uma proteína expressada pela primeira vez no estágio do paquíteno de espermatócitos e mais tarde é incorporada na cauda do espermatozoide (JAMSAI et al., 2008); no domínio de adenosina desaminase 1 (ADAD1), também conhecido como proteína de ligação, a RNA testículo-nuclear (Tenr) que é um gene essencial para a fertilidade masculina de camundongos (CONNOLLY et al., 2005); TULP2, um gene altamente conservado de função desconhecida, mas altamente expresso nos testículos; CIZ1, um gene expresso em ondas durante a diferenciação de espermatozoides, relacionado com a replicação de DNA e reparo da quebra de DNA (GREAVES et al., 2012).

Enfim, já se sabe que o miR-1246 é importante para uma espermatogênese adequada e baseado nos resultados das análises de correlação realizadas neste estudo, parece que este microRNA também pode influenciar direta ou indiretamente de forma positiva o desenvolvimento embrionário inicial.

Não foi encontrado nenhum trabalho descrevendo possíveis ações do miR-11976, sendo necessário estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para se identificar como este miRNA está associado a taxa de clivagem.

Em relação ao miR-335, vários autores já o detectaram em espermatozoides de indivíduos férteis (ABU-HALIMA et al., 2013; SALAS-HUETOS et al., 2014; KRAWETZ et al., 2011). Alguns estudos mostraram que alguns valores de miR-335 estão negativamente correlacionados com a concentração de espermatozoides, indicando uma associação entre um menor nível de expressão desses miRNAs e uma menor produção de espermatozoides no ejaculado (SALAS-HUETOS et al., 2015)

Um estudo *in vivo* mostrou altos níveis de expressão de miR-335-5p em osteoblastos e condrócitos hipertróficos de embriões de camundongo, indicando um papel central do miR-335-5p na regulação do desenvolvimento ósseo. Neste estudo observou-se que o miR-335-5p ativa a sinalização Wnt e promove a diferenciação osteogênica pela regulação negativa de DKK1. Essa regulação específica da célula e do desenvolvimento é essencial e obrigatória para o início e progressão da diferenciação osteogênica (ZHANG et al., 2011). Este caráter regulatório pode sugerir também alguma influencia no desenvolvimento embrionário inicial, uma vez que, no presente estudo notou-se que, quando presente em células espermáticas bovinas, uma correlação negativa com a taxa de blastocistos formadas é observada.

Dentre os 6 miRNAs espermáticos que apresentaram correlação significativa, o miR-11975 apresentou correlação negativa com a taxa de blastocistos obtida na PIVE. Os dados obtidos neste estudo sugerem que, este miRNA, quando superexpresso nas células

espermáticas, indica uma menor probabilidade de formar blastocistos durante a PIVE, o que pode insinuar uma má qualidade espermática, sugerindo uma possível influência negativa deste miRNA espermático no desenvolvimento embrionário inicial. Nada foi encontrado descrevendo possíveis ações deste miRNA, sendo necessário mais estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para se identificar como este miRNA está associado ao desenvolvimento inicial.

7. CONCLUSÃO

O miRNA bta-miR-425-5p possui potencial para ser utilizado como marcador de fertilidade em touros por estar associado a um desenvolvimento embrionário inicial satisfatório.

Os miRNAs bta-miR-1246, bta-miR-11975, bta-miR-2285bf, bta-miR-335 e bta-miR-7 possuem potencial para serem utilizados como marcadores de problemas de fertilidade em touro, pois estão associados a um processo de desenvolvimento embrionário inicial insatisfatório

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464 p.
- ABU-HALIMA, Masood et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 5, p. 1249-1255. e16, 2013. [10.1016/j.fertnstert.2012.11.054](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.054)
- ALOMAR, M. et al. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. **Reproduction, Fertility And Development**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.395-402, 2006. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd05132>.
- AMANN, R P.; SCHANBACHER, B D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v.57, n 2, p.380- 403, 1983, jul. 1983. PMID: 6352590
- AVERY, B.; GREVE, T..Impact of PercollR on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.871-878, out. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00272-a](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x(95)00272-a).
- BALHORN, R..A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.298-305, 1 maio 1982. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.93.2.298>.
- BALHORN, R. Sperm Chromatin: an overview. In: ZINI, Armand; AGARWAL, Ashok. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. New York: Springer, 2011. Cap. 1. p. 3-18. Disponível em: <<https://www.springer.com/gp/book/9781441917812>>. Acesso em: 02 dez. 2019.
- BANKS, W J. **Histologia Veterinária Aplicada: Sistema Reprodutor Masculino**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991. 629 p.
- BARROSO, Gerardo et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.835-848, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.06.030>.
- BARTEL, David P. MicroRNAs. **Cell**, [s.l.], v. 116, n. 2, p.281-297, jan. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
- BELETTI, Marcelo. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p. 92-6, 2013. Disponível em <[http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20\(RB465\).pdf](http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20(RB465).pdf)>. Acesso em 02 dez 2019.
- BILLARD, R..Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Développement**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.877-920, 1986.EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:19860601>.
- BITEL, Claudine L.; SINGH, Vir; FREDERIKSE, Peter H..MiR-124, miR-125b, let-7 and Vesicle Transport Proteins in Squid Lenses in *L. pealei*. **Current Eye Research**, [s.l.], v. 37, n.

5, p.388-394, 18 jan. 2012. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.3109/02713683.2011.635833>.

BLACK, Joshua C.; WHETSTINE, Johnathan R. Chromatin landscape. **Epigenetics**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.9-15, jan. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.6.1.13331>.

BLOCH, David. A catalog of sperm histones. **Genetics**, v.61, suppl., p.93-111, 1969
 PMID:5345404

BOBRIE, Angélique et al. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. **Traffic**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.1659-1668, 30 jun. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.j.; GADELLA, B.m..A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, [s.l.], v. 68, p.147-155, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.058>.

BUAAS, F William et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.647-652, 23 maio 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1366>.

CAO, X.; PFAFF, S. L.; GAGE, F. H..A functional study of miR-124 in the developing neural tube. **Genes & Development**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.531-536, 1 mar.2007. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1519207>.

CAO, Hui et al. MicroRNA-194 Regulates the Development and Differentiation of Sensory Patches and Statoacoustic Ganglion of Inner Ear by Fgf4. **Medical Science Monitor**, [s.l.], v. 24, p.1712-1723, 23 mar. 2018. International Scientific Information, Inc.. <http://dx.doi.org/10.12659/msm.906277>.

CARRELL, Douglas T..Epigenetics of the male gamete. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.267-274, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036>.
 CASTRO, L.s. et al. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. **Theriogenology**, [s.l.], v. 107, p.142-148, fev. 2018b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.006>.

CASTRO, L.s. et al. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. **Theriogenology**, [s.l.], v. 107, p.142-148, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.006>.

CHEN, Xi et al. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. **Trends In Cell Biology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.125-132, mar. 2012a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>.

CHEN, Yong; LIERSCH, Ruediger; DETMAR, Michael. The miR-290-295 cluster suppresses autophagic cell death of melanoma cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.808-818, 13 nov. 2012b. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep00808>.

CHENG, Li-chun et al. MiR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. **Nature Neuroscience**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.399-408, 15 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2294>.

CHEUNG, Louisa et al. Sex-different and growth hormone-regulated expression of microRNA in rat liver. **Bmc Molecular Biology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.13-17, 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-10-13>.

CHO, Jung Ah et al. MicroRNA expression profiling in neurogenesis of adipose tissue-derived stem cells. **Journal Of Genetics**, [s.l.], v. 90, n. 1, p.81-93, abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12041-011-0041-6>.

CIERESZKO, Andrzej et al. Characterization and cryopreservation of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen from Lake Łebsko, Poland. **Fundamental And Applied Limnology / Archiv Für Hydrobiologie**, [s.l.], v. 173, n. 1, p.59-65, 1 out. 2008. Schweizerbart. <http://dx.doi.org/10.1127/1863-9135/2008/0173-0059>.

CONNOLLY, Charles M.; DEARTH, Andrea T.; BRAUN, Robert E.. Disruption of murine Tenr results in teratospermia and male infertility. **Developmental Biology**, [s.l.], v. 278, n. 1, p.13-21, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.10.009>.

COSTA, Everton de Brito Oliveira; PACHECO, Cristiane. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.125-136, 24 dez. 2013. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2013v34n2p125>.

CRISTÓBAL, Ion et al. Potential therapeutic value of miR-425-5p in metastatic colorectal cancer. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 11, p.2213-2214, 9 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12902>.

CUI, Xiang-shun et al. Gene Expression of Cox5a, 5b, or 6b1 and Their Roles in Preimplantation Mouse Embryos1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.601-610, 1 mar. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.105.045633>

CUI, na et al. MicroRNA-224 regulates self-renewal of mouse spermatogonial stem cells viatargeting DMRT1. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1503-1512, 21 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12838>.

DADOUNE, Jean-pierre. Spermatozoal RNAs: What about their functions?. **Microscopy Research And Technique**, [s.l.], v. 72, n. 8, p.536-551, ago. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.20697>.

DANILENKO, Dimitry M. et al. Recombinant Rat Fibroblast Growth Factor-16: Structure and Biological Activity. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 361, n. 1, p.34-46, jan. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1998.0967>.

DOMINGUEZ, Francisco et al. Embryonic miRNA Profiles of Normal and Ectopic Pregnancies. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.102185-102188, 11 jul. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102185>.

DUAN, Jingjing et al. Onco-miR-130 promotes cell proliferation and migration by targeting TGF β 2 in gastric cancer. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 28, p.44522-44533, 10 jun. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9936>.

ESTELLA, Carlos et al. MiRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 7, p.41080-4185, 20 jul. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041080>.

FAGERLIND, M et al. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. **Reproduction In Domestic Animals**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.587-594, 21 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12531>.

FLESCH, Frits M; GADELLA, Barend M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Biomembranes**, [s.l.], v. 1469, n. 3, p.197-235, nov. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4157\(00\)00018-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4157(00)00018-6).

FRANÇA, L R; RUSSELL, L D. The testis of domestic animals. In: MARTINEZ-GARCIA, F; REGADERA, J. **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p. 197-219.

FUJITA, Yasunori et al. MiR-130a activates apoptotic signaling through activation of caspase-8 in taxane-resistant prostate cancer cells. **The Prostate**, [s.l.], v. 75, n. 14, p.1568-1578, 12 jun. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pros.23031>.

GARCIA, Alexandre Rosetto. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (Bos taurus taurus)**. 2004. 258 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-22092006-160932/en.php>>. Acesso em: 02 dez. 2019.

GARCIA, Alexandre Rosetto. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema?. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p.33-39, mar. 2017. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p033-039%20\(RB678\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p033-039%20(RB678).pdf)>. Acesso em: 02 dez. 2019.

GARNER, D L; HAFEZ, e S. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, e S. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 7.

GERLACH, Cory V.; VAIDYA, Vishal S.. MicroRNAs in injury and repair. **Archives Of Toxicology**, [s.l.], v. 91, n. 8, p.2781-2797, 13 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-017-1974-1>.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; FIGUEIREDO, José Ricardo de; FREITAS, Vicente José de Figueiredo. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2008. 395 p.

GOVINDARAJU, Aruna et al. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.82-92, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-10-82>

GRANDJEAN, V. et al. The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. **Development**, [s.l.], v. 136, n. 21, p.3647-3655, 9 out. 2009. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.041061>.

GREAVES, E. A. et al. Cancer-associated variant expression and interaction of CIZ1 with cyclin A1 in differentiating male germ cells. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 125, n. 10, p.2466-2477, 24 fev. 2012. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.101097>.

HE, Zuping et al. Gfra1 Silencing in Mouse Spermatogonial Stem Cells Results in Their Differentiation Via the Inactivation of RET Tyrosine Kinase1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 77, n. 4, p.723-733, 1 out. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.107.062513>.

HE, L et al. Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. **Cell Death & Disease**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1205-1215, maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.127>.

HERCEG, Zdenko; VAISSIÈRE, Thomas. Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between the environment and the genome. **Epigenetics**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.804-819, jul. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.6.7.16262>.

HESS, Rex A.; FRANÇA, Luiz Renato de. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p.1-15, 2009. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1.

HUNTER, G.; DEMMENT, R.; MILLER, D. Development of Strength and Maximum Oxygen Uptake during Simultaneous Training for Strength and Endurance. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 27, n. 3, p. 269–275, set.1987. PMID: 3431108

JAMSAI, Duangporn et al. Characterization of gametogenetin 1 (GGN1) and its potential role in male fertility through the interaction with the ion channel regulator, cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) in the sperm tail. **Reproduction**, [s.l.], v. 135, n. 6, p.751-759, jun. 2008. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep-07-0485>.

JEONG, B-c et al. MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression. **Cell Death & Disease**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.1532-1537, nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.485>.

JOHANISSON, E.. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.404-412, 1 jul. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/6.4.404>.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, Perry. **Reproduction in Domestic Animals**. 4. ed. California: Academic Press, 1991. p. 173-219.

- JOHNSON, Graham D et al. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, [s.l.], v. 141, n. 1, p.21-36, jan. 2011. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep-10-0322>.
- JUNG, Kwang Hwa et al. MicroRNA Regulates Hepatocytic Differentiation of Progenitor Cells by Targeting YAP1. **Stem Cells**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.1284-1296, 1 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.2283>.
- KNELANGEN, Julia M. et al. MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells. **Physiological Genomics**, [s.l.], v. 43, n. 10, p.611-620, maio 2011. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00116.2010>.
- KOTAJA, Noora. MicroRNAs and spermatogenesis. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 101, n. 6, p.1552-1562, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.025>.
- KOUHKAN, Fatemeh et al. The Effect of Mir-451 Upregulation on Erythroid Lineage Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. **Cell J (yakhteh)**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.165-178, jan. 2017. Royan Institute, Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR). <http://dx.doi.org/10.22074/cellj.2016.4311>.
- KRAWETZ, Stephen A.. Paternal contribution: new insights and future challenges. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.633-642, ago. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1654>.
- KRAWETZ, Stephen A. et al. A survey of small RNAs in human sperm. **Human reproduction**, v. 26, n. 12, p. 3401-3412, 2011. [10.1093/humrep/der329](http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der329)
- KROL, Jacek; LOEDIGE, Inga; FILIPOWICZ, Witold. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.597-610, 27 jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2843>.
- KROPP, Jenna et al. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.280-295, 5 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3673-y>.
- KUOKKANEN, Satu et al. Genomic Profiling of MicroRNAs and Messenger RNAs Reveals Hormonal Regulation in MicroRNA Expression in Human Endometrium1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 82, n. 4, p.791-801, 1 abr. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.109.081059>.
- LEE, Man Ryul; KIM, Jong Soo; KIM, Kye-seong. MiR-124a Is Important for Migratory Cell Fate Transition During Gastrulation of Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, [s.l.], v. 28, n. 9, p.1550-1559, 27 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.490>.

- LEITE, Ticiano Guimarães. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Reprodução Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/LGPD-7Q2P86/1/disserta_o_mestrado_ticiano_guimar_es_leite.pdf>. Acesso em 02 dez 2019.
- LI, Jun et al. MicroRNA-194 promotes osteoblast differentiation via downregulating STAT1. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 460, n. 2, p.482-488, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.059>.
- LI, Ningwei et al. MiR-130a and MiR-374a Function as Novel Regulators of Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer A2780 Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.1-12, 4 jun. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128886>.
- LI, Xiufang et al. MicroRNA-224 delays oocyte maturation through targeting Ptx3 in cumulus cells. **Mechanisms Of Development**, [s.l.], v. 143, p.20-25, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2016.12.004>.
- LICHNER, Zsuzsanna et al. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. **Differentiation**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.11-24, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2010.08.002>.
- LIU, Changmei; ZHAO, Xinyu. MicroRNAs in Adult and Embryonic Neurogenesis. **Neuromolecular Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.141-152, 14 jul. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12017-009-8077-y>.
- LIU, K. et al. MiR-124 regulates early neurogenesis in the optic vesicle and forebrain, targeting NeuroD1. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 39, n. 7, p.2869-2879, 3 dez. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq904>.
- LIU, Yang et al. MiR-130a-3p regulates cell migration and invasion via inhibition of Smad4 in gemcitabine resistant hepatoma cells. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.1-11, 27 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-016-0296-0>.
- LIU, Sheng-yao et al. MiR-451 inhibits cell growth, migration and angiogenesis in human osteosarcoma via down-regulating IL 6R. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 482, n. 4, p.987-993, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.145>
- LUCIO, Aline C. et al. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, [s.l.], v. 86, n. 4, p.924-933, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>.
- MA, Jun et al. NF-kappaB-dependent MicroRNA-425 upregulation promotes gastric cancer cell growth by targeting PTEN upon IL-1 β induction. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.40-51, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-13-40>.

- MARGUERAT, Samuel; BÄHLER, Jürg. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.569-579, 27 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>.
- MÉCHALI, Marcel et al. Proto-oncogenes and embryonic development. **Biochimie**, [s.l.], v. 70, n. 7, p.895-899, jul. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90230-1](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084(88)90230-1).
- MENDITI, Karla Baptista da Cunha; KANG, Hye Chung. O Papel das Proteínas Histonas nas Neoplasias Hematológicas: The Role of Histones Proteins in Hematological Neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Niterói, v. 4, n. 53, p.453-460, abr. 2007. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v04/pdf/revisao2.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2019.
- MITTELBRUNN, María et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nature Communications**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.282-285, 19 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1285>.
- MONDOU, E. et al. Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. **Mhr: Basic science of reproductive medicine**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.425-434, 4 abr. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gas015>.
- MORIN, R. D. et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. **Genome Research**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.610-621, 17 mar.2008. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.7179508>.
- MORTIMER, S..A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 3, n. 5, p.403-439, 1 set. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/3.5.403>.
- MRUK, Dolores D.; CHENG, C. Yan.Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.747-806, 1 out. 2004. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2003-0022>.
- NICOLI, Stefania et al. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. **Nature**, [s.l.], v. 464, n. 7292, p.1196-1200, abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08889>..
- O'CONNELL, Ryan M. et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.111-122, fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2708>.
- OKO, R. J. et al. Chromatin Reorganization in Rat Spermatids during the Disappearance of Testis-Specific Histone, H1t, and the Appearance of Transition Proteins TP1 and TP21. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 54, n. 5, p.1141-1157, 1 maio 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod54.5.1141>.
- OLIVA, Rafael. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.417-435, 31 mar. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dml009>.

- OSTERMEIER, G. Charles et al. Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, [s.l.], v. 429, n. 6988, p.154-154, maio 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/429154a>.
- OSTERMEIER, G. Charles et al. A suite of novel human spermatozoal RNAs. **Journal Of Andrology**, S.i, v. 26, n. 1, p.70-74, jan. 2005. PMID:15611569
- PALMA, G. A.; SINOWATZ, F.. Male and Female Effects on the In Vitro Production of Bovine Embryos. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.257-262, out. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0264.2004.00543.x>.
- PAN, y et al. MicroRNA-130a inhibits cell proliferation, invasion and migration in human breast cancer by targetin. **International Journal Of Experimental Pathology**, Gansu, v. 1, n. 8, p.384-393, 1 jan. 2015. PMID: 25755726.
- PANTANO, Lorena et al. The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein-coding genes. **Rna**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.1085-1095, 22 abr. 2015. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.046482.114>.
- PASE, Luke et al. MiR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2. **Blood**, [s.l.], v. 113, n. 8, p.1794-1804, 19 fev. 2009. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-05-155812>.
- QIU, Shuwei et al. Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. **Journal Of Translational Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.10-21, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-10>.
- REAL, Francisca M. et al. A MicroRNA (mmu-miR-124) Prevents Sox9 Expression in Developing Mouse Ovarian Cells1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 89, n. 4, p.78-88, 1 out. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.113.110957>.
- REVEL, Ariel et al. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. **Human Reproduction**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.2830-2840, 16 ago. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der255>.
- ROCCARO, Aldo M. et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 123, n. 4, p.1542-1555, 1 mar. 2013. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci66517>.
- RODGERS, A. B. et al. Paternal Stress Exposure Alters Sperm MicroRNA Content and Reprograms Offspring HPA Stress Axis Regulation. **Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 33, n. 21, p.9003-9012, 22 maio 2013. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0914-13.2013>.
- RURANGWA, e et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, [s.l.], v. 234, n. 1-4, p.1-28, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>.

SALAS-HUETOS, Albert et al. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 1, p. 213-222. e4, 2014.

SALAS-HUETOS, Albert et al. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. **Fertility and sterility**, v. 104, n. 3, p. 591-601, 2015.

SHA, Ai-guo et al. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.150-155, jul. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.072>.

SHARMA, Rakesh; AGARWAL, Ashok. Spermatogenesis: An Overview. **Sperm Chromatin**, [s.l.], p.19-44, 2011. Springer New York.http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2.

SHARPE, Richard M. Sperm counts and fertility in men: a rocky road ahead. **Embo Reports**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.398-403, 10 abr. 2012.EMBO.<http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.50>.

SHI, Zhendong et al. MiR-340 Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Progression by Reversing EZH2 Mediated miRNAs Dysregulated Expressions. **Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 8, n. 15, p.3037-3048, 2017. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.19315>.

SILVA, Ricardo Tomaz da. **Proteoma Nuclear e Micro-Rnas de Espermatozoides de Bovinos Férteis e Subférteis**. 2018. 79 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Produção Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/22221/7/ProteomaNuclearMicroRNA.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2019.

SINGH, Bhairab N. et al. Etv2-miR-130a-Jarid2 cascade regulates vascular patterning during embryogenesis. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.189-199, 12 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0189010>.

SMIRNOVA, Lena et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. **European Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.1469-1477, mar. 2005. Wiley.<http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03978.x>.

SMYTH, Neil et al. Absence of Basement Membranes after Targeting theLAMC1Gene Results in Embryonic Lethality Due to Failure of Endoderm Differentiation. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 144, n. 1, p.151-160, 11 jan. 1999. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.144.1.151>.

SONG, Su-zhen et al. Targeting of SPP1 by microRNA?340 inhibits gastric cancer cell epithelial–mesenchymal transition through inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], p.18587-18601, 5 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28497>.

STOJKOVIC, Miodrag et al. 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 Culture1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.904-909, 1 mar. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.

STÜCKRATH, Isabel et al. Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. **Oncotarget**, [s.l.], v. 6, n. 15, p.13387-13401, 19 abr. 2015. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3874>.

SUTOVSKY, Peter; SCHATTE, Gerald. Paternal Contributions to the Mammalian Zygote: Fertilization after Sperm-Egg Fusion. **International Review Of Cytology**, [s.l.], p.1-65, 1999. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62703-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62703-5).

SZULWACH, Keith E. et al. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 189, n. 1, p.127-141, 5 abr. 2010. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200908151>.

TAY, Yvonne et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, [s.l.], v. 455, n. 7216, p.1124-1128, 17 set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07299>.

THURNHERR, Thomas et al. Differentially Expressed miRNAs in Hepatocellular Carcinoma Target Genes in the Genetic Information Processing and Metabolism Pathways. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-12, 28 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep20065>.

TIAN, Qiao?xian et al. Comprehensive analysis of the differential expression profile of microRNAs in missed abortion. **The Kaohsiung Journal Of Medical Sciences**, [s.l.], p.1-8, 5 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/kjm2.12144>.

TRAPNELL, Cole; PACHTER, Lior; SALZBERG, Steven L.. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 25, n. 9, p.1105-1111, 16 mar. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>.

TSUCHIYA, N. et al. Tumor Suppressor miR-22 Determines p53-Dependent Cellular Fate through Post-transcriptional Regulation of p21. **Cancer Research**, [s.l.], v. 71, n. 13, p.4628-4639, 12 maio 2011. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-2475>.

VAHDAT-LASEMI, Maryam et al. Intraovarian injection of miR?224 as a marker of polycystic ovarian syndrome declines oocyte compete. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 234, n. 8, p.13858-13866, 3 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28067>.

VISHNOI, Anchal; RANI, Sweta. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.1-10, 9 nov. 2016. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.57-63, jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>.

WANG, Pei et al. Differential expression of microRNAs in 2-cell and 4-cell mouse embryos. **Zygote**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.455-461, 26 abr. 2013. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0967199413000117>.

WANG, Rong et al. Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide suppresses the migration and invasion of human extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells by down-regulating MMP2 through inhibition of FAK/SRC/PI3K/AKT pathway. **Toxicology**, [s.l.], v. 386, p.72-83, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.008>.

WARD, W. Steven; COFFEY, Donald S.. DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cell. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.569-574, 1 abr. 1991. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod44.4.569>.

WARD, Fabian et al. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction And Development**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.47-55, 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1060>.

WARD, F et al. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. **Theriogenology**, [s.l.], v. 59, n. 7, p.1575-1584, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01202-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01202-5).

WARD, W. Steven. Regulating DNA Supercoiling: Sperm Points the Way1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 84, n. 5, p.841-843, 1 maio 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.111.090951>.

WINTER, Julia et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.228-234, mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0309-228>.

WÓJCICKA, Anna; KOLANOWSKA, Monika; JA?D?EWSKI, Krystian. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. **European Journal Of Endocrinology**, [s.l.], v. 174, n. 3, p.89-98, mar. 2016. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/eje-15-0647>.

WOLFFE, Alan P.; GUSCHIN, Dmitry. Review: Chromatin Structural Features and Targets That Regulate Transcription. **Journal Of Structural Biology**, [s.l.], v. 129, n. 2-3, p.102-122, abr. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jsbi.2000.4217>.

WU, Yibo et al. Expression of Flotilin-2 and Acrosome Biogenesis Are Regulated by MiR-124 during Spermatogenesis. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.1-12, 27 ago. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136671>.

- XIAOPENG, An et al. NTS Targeted By miR-182 Modulates the Apoptosis of Goat Endometrial Epithelial Cells. **Acta Veterinaria**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.340-347, 1 set. 2019. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/acve-2019-0028>.
- XU, Dan et al. MiR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 193, n. 2, p.409-424, 18 abr. 2011. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201010100>.
- XU, Jun et al. MiR-194 Regulates Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells by Targeting Sox5. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.31861-31865, 1 mar.2012a. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031861>.
- XU, Ning et al. Upregulated miR-130a increases drug resistance by regulating RUNX3 and Wnt signaling in cisplatin-treated HCC cell. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 425, n. 2, p.468-472, ago. 2012b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.127>.
- YADAV, Santosh K. et al. The thermo-sensitive gene expression signatures of spermatogenesis. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-22, 2 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-018-0372-8>.
- YANAGIMACHI, R; KNOBIL, e; NEILL, J D. **The Physiology of Reproduction**. Hamburgo: Raven Press, 1994.
- YUAN, Jiao et al. MicroRNA-425-5p promotes tau phosphorylation and cell apoptosis in Alzheimer's disease by targeting heat shock protein B8. **Journal of Neural Transmission**, p. 1-8, 2020. 10.1007/s00702-019-02134-5
- ZENG, Fanyi; BALDWIN, Don A.; SCHULTZ, Richard M.. Transcript profiling during preimplantation mouse development. **Developmental Biology**, [s.l.], v. 272, n. 2, p.483-496, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.018>.
- ZHANG, B.r. et al. Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology**, [s.l.], v. 48, n. 2, p.221-231, jul. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)84069-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(97)84069-1).
- ZHANG, Yu et al. P53 downregulates Down syndrome-associated DYRK1A through miR-1246. **Embo Reports**, [s.l.], v. 12, n. 8, p.811-817, 3 jun. 2011.EMBO. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.98>.
- ZHANG, Jin et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 8, p. 1953-1963, 2011. [10.1002/jbmr.377](http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.377)
- ZHANG, Ye et al. MicroRNA-425-5p regulates chemoresistance in colorectal cancer cells via regulation of Programmed Cell Death 10. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.360-369, 9 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12742>.

ZHU, Xishan et al. Studies on microRNAs that are correlated with the cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 390, n. 1-2, p.75-84, 3 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-013-1958-2>

ZHU, X et al. Functional studies of miR-130a on the inhibitory pathways of apoptosis in patients with chronic myeloid leukemia. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 22, n. 12, p.573-580, 23 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2015.50>.

ANEXO I

Quadro com todas os microRNAs espermáticos nas amostras de cada touro com a quantidade de reads mensurada em cada amostra (total e em cada touro)

microRNAs	TOTAL DE READS							
	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Touro 4	Touro 5	Touro 6	Touro 7	Touro 8
bta-let-7-a-3p_MIMAT0004330	0	0	0	0	5	7	0	0
bta-let-7-a-5p_MIMAT0003844	1421	6271	745	1513	4096	6319	6231	7439
bta-let-7b_MIMAT0004331	347	2714	221	265	677	1067	415	2071
bta-let-7c_MIMAT0004332	111	329	8	129	77	116	52	413
bta-let-7d_MIMAT0003810	60	232	59	2	117	257	120	171
bta-let-7e_MIMAT0004333	13	259	13	7	43	39	20	181
bta-let-7f_MIMAT0003519	249	2170	148	482	251	367	618	651
bta-let-7g_MIMAT0003838	267	584	66	146	520	820	1475	1120
bta-let-7i_MIMAT0003851	261	0	23	2	115	144	148	376
bta-miR-10020_MIMAT0040419	0	0	0	0	0	0	10	0
bta-miR-100_MIMAT0009215	2625	960	1062	205	7295	9649	52946	7896
bta-miR-10167-3p_MIMAT0040914	0	0	1	0	1	47	29	26

bta-miR-12030_MIMAT0046723	2	2	0	2	2	4	3	2
bta-miR-12034_MIMAT0046727	1	0	0	0	7	14	0	0
bta-miR-12056_MIMAT0046763	0	0	0	0	0	17	0	1
bta-miR-122_MIMAT0003849	0	0	0	0	4	1	11	111
bta-miR-1246_MIMAT0024567	1679	694	1322	491	1906	7951	1126	3390
bta-miR-1249_MIMAT0009976	0	0	0	0	0	11	0	0
bta-miR-124a_MIMAT0003811_bta- miR-124b_MIMAT0013774	24	0	0	0	7	6	44	161
bta-miR-125a_MIMAT0003538	0	0	0	0	2	1	25	121
bta-miR-125b_MIMAT0003539	58	0	0	1	554	550	1127	657
bta-miR-1260b_MIMAT0024568	0	0	0	0	6	8	0	0
bta-miR-126-3p_MIMAT0003540	0	0	0	0	0	0	0	12
bta-miR-126-5p_MIMAT0004328	0	0	0	0	0	0	0	32
bta-miR-1271_MIMAT0009975	17	0	0	0	10	11	0	34
bta-miR-1277_MIMAT0024569	0	0	0	0	3	3	10	0
bta-miR-127_MIMAT0003787	61	0	30	0	2	5	0	0
bta-miR-128_MIMAT0003541	35	0	0	30	13	22	99	67
bta-miR-129-3p_MIMAT0009222	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-1306_MIMAT0009974	0	0	0	7	0	0	0	0
bta-miR-1307_MIMAT0009969	1	1	1	0	33	23	0	63
bta-miR-130a_MIMAT0009223	0	1	0	0	3	18	0	0

bta-miR-130b_MIMAT0009224	67	0	27	0	147	231	247	94
bta-miR-132_MIMAT0003812	275	0	175	94	698	686	1750	656
bta-miR-133a_MIMAT0009225	0	0	0	0	0	0	0	1
bta-miR-135a_MIMAT0009228	0	0	0	0	7	14	28	0
bta-miR-135b_MIMAT0009229	0	0	0	0	2	0	0	0
bta-miR-136_MIMAT0009230	0	0	0	0	16	0	10	21
bta-miR-137_MIMAT0009231	0	2	0	0	9	19	26	0
bta-miR-1388-5p_MIMAT0013590	0	0	0	0	8	1	0	13
bta-miR-138_MIMAT0003813	0	0	0	0	0	17	8	0
bta-miR-139_MIMAT0003788	175	1	55	0	140	88	365	49
bta-miR-140_MIMAT0003789	0	0	10	0	143	115	214	92
bta-miR-141_MIMAT0009232	134	1418	127	206	56	61	121	165
bta-miR-142-3p_MIMAT0003791	0	0	0	0	0	2	0	0
bta-miR-142-5p_MIMAT0003790	0	0	0	51	18	12	27	10
bta-miR-143_MIMAT0009233	41	0	1	52	13	31	34	316
bta-miR-145_MIMAT0003542	0	0	0	0	9	0	0	75
bta-miR-146a_MIMAT0009236	773	708	887	357	9257	16858	13383	10089
bta-miR-146b_MIMAT0009235	27	0	20	4	303	406	637	339
bta-miR-147_MIMAT0009237	0	0	0	0	0	7	10	0
bta-miR-148a_MIMAT0003522	0	0	5	0	3	1	5	0
bta-miR-148b_MIMAT0003814	4	0	0	0	6	15	29	17

bta-miR-150_MIMAT0003845	0	0	0	0	1	12	5	0
bta-miR-151-3p_MIMAT0003524	46	0	0	0	97	171	448	135
bta-miR-151-5p_MIMAT0003523	2493	1234	971	216	5617	9865	10601	6432
bta-miR-152_MIMAT0009238	0	0	0	0	9	23	22	0
bta-miR-153_MIMAT0009239	7	0	30	0	46	55	77	96
bta-miR-154a_MIMAT0009240	0	0	0	0	4	0	0	0
bta-miR-154c_MIMAT0025542	0	0	0	0	3	0	15	0
bta-miR-155_MIMAT0009241	0	0	0	0	0	1	4	0
bta-miR-1584-5p_MIMAT0011969	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-15a_MIMAT0004334	108	1	73	223	165	183	506	224
bta-miR-15b_MIMAT0003792	333	0	120	109	524	533	816	936
bta-miR-16a_MIMAT0009242	3066	298	792	32	8034	8331	19045	11350
bta-miR-16b_MIMAT0003525	6546	2937	1827	1087	13673	14601	24892	18440
bta-miR-17-3p_MIMAT0003816	0	0	0	0	86	93	298	45
bta-miR-17-5p_MIMAT0003815	294	0	160	2	595	1080	2079	713
bta-miR-1777a_MIMAT0012032	100	0	111	394	87	75	36	43
bta-miR-1777b_MIMAT0012046	58	0	90	388	54	80	36	43
bta-miR-181a_MIMAT0003543	0	0	0	0	14	6	10	140
bta-miR-181b_MIMAT0003793	0	0	0	0	19	0	0	0
bta-miR-181c_MIMAT0003817	45	0	0	0	40	22	34	0
bta-miR-181d_MIMAT0009243	19	0	0	1	8	16	0	0

bta-miR-182_MIMAT0009244	0	0	0	0	6	12	0	0
bta-miR-1839_MIMAT0009968	65	1	0	0	95	244	178	122
bta-miR-183_MIMAT0009245	0	1	10	0	1	0	0	0
bta-miR-184_MIMAT0009246	0	0	0	0	26	13	0	24
bta-miR-185_MIMAT0009247	69	384	52	0	107	113	50	116
bta-miR-186_MIMAT0003818	335	0	243	233	655	1258	3253	1461
bta-miR-18a_MIMAT0003526	213	313	252	73	601	1486	3420	796
bta-miR-18b_MIMAT0003517	4	8	52	0	43	93	327	39
bta-miR-190a_MIMAT0009251	12	0	1	0	6	10	13	9
bta-miR-190b_MIMAT0009252	16	1	14	0	100	103	248	37
bta-miR-191_MIMAT0003819	7090	5676	2436	988	11751	23927	36735	23869
bta-miR-192_MIMAT0003820	0	0	0	53	11	0	37	36
bta-miR-193-a-3p_MIMAT0003795	0	0	1	0	0	8	0	0
bta-miR-193b_MIMAT0009253	0	0	0	0	0	0	7	0
bta-miR-194_MIMAT0009254	0	0	0	0	2	1	19	1
bta-miR-195_MIMAT0004335	128	0	0	31	96	70	164	245
bta-miR-196a_MIMAT0009255	0	0	0	53	100	105	390	130
bta-miR-196b_MIMAT0009256	0	0	0	0	0	0	0	32
bta-miR-197_MIMAT0009257	0	0	0	0	0	0	0	25
bta-miR-199-a-3p_MIMAT0003746	0	0	0	0	2	15	12	44
bta-miR-199c_MIMAT0011871	0	0	0	0	2	15	12	44

bta-miR-19a_MIMAT0004336	0	0	4	0	20	44	30	70
bta-miR-19b_MIMAT0004337	14	0	14	0	46	114	107	86
bta-miR-1_MIMAT0009214	3	0	0	0	0	2	0	204
bta-miR-200a_MIMAT0003822	59	4	96	1	65	62	228	84
bta-miR-200b_MIMAT0003842	14	242	0	0	173	139	429	121
bta-miR-200c_MIMAT0003823	1	289	60	80	4	4	10	52
bta-miR-202_MIMAT0009259	0	0	0	0	0	6	0	0
bta-miR-204_MIMAT0004338	27	0	26	0	316	388	880	404
bta-miR-205_MIMAT0003545	0	1	13	1	0	4	15	0
bta-miR-20a_MIMAT0003527	520	242	283	60	1110	2111	5092	1349
bta-miR-20b_MIMAT0003796	3	0	2	0	10	21	32	9
bta-miR-210_MIMAT0003824	0	0	28	0	0	0	0	0
bta-miR-211_MIMAT0009263	1	0	0	0	0	7	10	0
bta-miR-212_MIMAT0009264	0	0	0	0	0	0	0	8
bta-miR-215_MIMAT0003797	0	0	0	50	0	7	0	0
bta-miR-21-5p_MIMAT0003528	2458	4211	1218	1119	4827	7230	20270	5901
bta-miR-216b_MIMAT0009266	0	0	0	0	1	1	29	0
bta-miR-217_MIMAT0009267	0	4	0	0	3	23	52	0
bta-miR-219-3p_MIMAT0012547	0	0	0	0	0	0	5	0
bta-miR-221_MIMAT0003529	26	0	0	65	1	0	26	5
bta-miR-222_MIMAT0003530	0	383	1	1	2	10	1	0

bta-miR-223_MIMAT0009270	52	161	8	2	1	8	19	106
bta-miR-22-3p_MIMAT0012536	513	35	403	491	1137	1820	2804	1974
bta-miR-224_MIMAT0009271	0	0	0	0	1	0	20	0
bta-miR-22-5p_MIMAT0003826	0	0	0	0	0	1	3	0
bta-miR-2284aa_MIMAT0025560	57	0	47	6	59	145	263	109
bta-miR-2284a_MIMAT0011906	0	0	0	0	0	0	1	0
bta-miR-2284b_MIMAT0011983	0	0	0	0	0	0	0	1
bta-miR-2284c_MIMAT0011926	0	0	0	0	1	4	9	0
bta-miR-2284d_MIMAT0011836	0	0	0	0	0	1	1	0
bta-miR-2284e_MIMAT0012080	0	0	0	0	1	0	0	0
bta-miR-2284-h-5p_MIMAT0012019	0	1	2	0	4	12	3	31
bta-miR-2284k_MIMAT0011907	201	0	114	15	407	722	1335	785
bta-miR-2284l_MIMAT0011824	0	0	0	0	1	14	5	6
bta-miR-2284m_MIMAT0011976	83	0	44	8	202	383	715	343
bta-miR-2284o_MIMAT0012068	0	0	0	0	1	0	0	0
bta-miR-2284p_MIMAT0011885	0	0	0	0	0	0	0	8
bta-miR-2284q_MIMAT0011957	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-2284v_MIMAT0011937	0	0	0	0	0	0	3	0
bta-miR-2284x_MIMAT0017395	654	0	387	81	1363	2156	3849	2688
bta-miR-2284y_MIMAT0024579	212	1	121	15	436	767	1420	860
bta-miR-2284z_MIMAT0025559	57	0	47	6	59	145	261	109

bta-miR-2285cf_MIMAT0046663	0	0	0	0	2	2	1	15
bta-miR-2285cl_MIMAT0046681	0	0	0	0	0	0	0	3
bta-miR-2285cm_MIMAT0046682	0	0	0	0	1	1	0	3
bta-miR-2285co_MIMAT0046686	0	0	0	0	3	0	4	0
bta-miR-2285cp_MIMAT0046687	0	0	0	0	1	1	5	0
bta-miR-2285cu_MIMAT0046698	0	0	0	0	0	0	1	2
bta-miR-2285e_MIMAT0024580	0	0	0	0	0	0	1	0
bta-miR-2285f_MIMAT0024581	0	0	0	12	6	7	8	0
bta-miR-2285i_MIMAT0024584	0	0	3	0	3	2	0	1
bta-miR-2285j_MIMAT0024585	0	0	0	0	4	6	1	18
bta-miR-2285k_MIMAT0024586	0	0	0	0	5	4	4	0
bta-miR-2285l_MIMAT0024587	0	0	0	0	0	4	0	0
bta-miR-2285m_MIMAT0025533	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-2285n_MIMAT0025531	0	0	0	0	0	4	1	0
bta-miR-2285q_MIMAT0025574	0	0	0	0	0	0	5	0
bta-miR-2285u_MIMAT0031094	0	0	0	0	0	4	3	0
bta-miR-2285v_MIMAT0025579	0	0	0	0	0	2	0	0
bta-miR-2299-3p_MIMAT0011808	0	0	0	0	3	0	0	0
bta-miR-2299-5p_MIMAT0011807	0	0	0	0	2	0	0	0
bta-miR-2305_MIMAT0011817	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-2320-3p_MIMAT0011845	0	0	0	0	1	5	24	0

bta-miR-2336_MIMAT0011869	0	0	0	0	0	23	10	0
bta-miR-2342_MIMAT0011877	0	0	0	0	0	8	2	0
bta-miR-2346_MIMAT0011881	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-2363_MIMAT0011901	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-2367-3p_MIMAT0011910	0	0	0	0	0	2	0	0
bta-miR-2367-5p_MIMAT0011909	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-2397-3p_MIMAT0011952	0	0	0	0	0	0	5	0
bta-miR-2399-3p_MIMAT0011955	0	0	0	0	0	0	4	12
bta-miR-23a_MIMAT0003827	158	1427	0	0	462	362	1045	851
bta-miR-23-b-3p_MIMAT0003852	64	751	19	73	61	27	78	110
bta-miR-2419-5p_MIMAT0011985	0	0	0	0	11	12	52	0
bta-miR-2435_MIMAT0012007	0	0	0	0	5	7	25	44
bta-miR-24-3p_MIMAT0003840	132	588	0	1	31	28	46	124
bta-miR-2453_MIMAT0012034	0	0	0	0	0	1	1	0
bta-miR-2463_MIMAT0012050	0	0	0	0	0	4	0	0
bta-miR-2468_MIMAT0012058	0	0	0	0	12	27	19	0
bta-miR-2478_MIMAT0012070	0	0	0	0	0	19	0	0
bta-miR-2483-3p_MIMAT0012076	0	0	0	0	0	8	22	27
bta-miR-2483-5p_MIMAT0012075	0	0	0	0	6	0	0	51
bta-miR-2484_MIMAT0012077	0	0	0	0	9	0	0	0
bta-miR-24_MIMAT0009250	27	0	0	0	6	14	40	71

bta-miR-302d_MIMAT0009279	0	0	0	0	0	1	0	24
bta-miR-30-a-5p_MIMAT0003841	26	0	23	0	52	185	287	144
bta-miR-30-b-3p_MIMAT0012534	32	0	0	0	0	0	0	0
bta-miR-30-b-5p_MIMAT0003547	0	0	0	0	35	83	146	93
bta-miR-30c_MIMAT0003850	0	0	0	0	1	3	3	35
bta-miR-30d_MIMAT0003533	162	0	99	49	497	725	1775	677
bta-miR-30-e-5p_MIMAT0003799	86	73	154	4	303	377	946	397
bta-miR-30f_MIMAT0009282	0	0	0	0	0	5	0	0
bta-miR-3141_MIMAT0024573	0	0	0	0	0	37	54	39
bta-miR-31_MIMAT0003548	38	92	55	233	24	19	72	42
bta-miR-320a_MIMAT0003534	34	79	2	59	16	23	29	23
bta-miR-323_MIMAT0009284	0	0	0	0	14	14	76	0
bta-miR-324_MIMAT0009285	0	0	0	0	3	36	18	21
bta-miR-32_MIMAT0009283	21	0	0	0	53	39	203	64
bta-miR-331-3p_MIMAT0004339	0	0	0	0	0	7	0	1
bta-miR-331-5p_MIMAT0026716	0	0	1	0	0	0	0	0
bta-miR-335_MIMAT0009291	556	42	343	148	1177	2775	2396	2975
bta-miR-338_MIMAT0009292	0	0	0	0	2	0	4	17
bta-miR-339a_MIMAT0009293	0	0	10	0	8	26	31	45
bta-miR-339b_MIMAT0012038	0	0	10	0	8	26	31	45
bta-miR-33a_MIMAT0009294	0	0	0	1	0	0	0	0

bta-miR-340_MIMAT0009296	0	0	0	0	2	4	1	0
bta-miR-342_MIMAT0003846	0	0	0	0	0	10	27	56
bta-miR-3431_MIMAT0017394	0	0	0	0	0	24	40	0
bta-miR-3432a_MIMAT0017396	404	0	93	190	1460	2295	2345	1849
bta-miR-3432b_MIMAT0036976	0	0	0	0	17	16	2	32
bta-miR-345-5p_MIMAT0003800	0	0	27	0	5	2	34	0
bta-miR-34a_MIMAT0004340	31	0	0	0	30	40	32	151
bta-miR-34b_MIMAT0003549	534	452	349	158	1919	1911	3231	3528
bta-miR-34c_MIMAT0003854	2352	2736	1121	604	5802	5529	5143	9164
bta-miR-361_MIMAT0003830	3	0	0	0	2	2	2	0
bta-miR-362-3p_MIMAT0012548	0	0	0	0	0	16	50	0
bta-miR-362-5p_MIMAT0009298	0	0	1	0	0	0	0	0
bta-miR-363_MIMAT0003855	0	0	0	0	3	10	9	0
bta-miR-3660_MIMAT0025555	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-369-3p_MIMAT0003802	1	0	0	0	4	3	17	10
bta-miR-371_MIMAT0009301	0	0	0	0	3	0	17	29
bta-miR-374a_MIMAT0004342	0	0	3	0	1	9	25	7
bta-miR-374b_MIMAT0009302	0	0	0	0	4	2	0	0
bta-miR-375_MIMAT0009303	0	247	18	0	49	77	241	102
bta-miR-376b_MIMAT0009945	0	0	6	0	9	2	18	0
bta-miR-376c_MIMAT0009947	0	0	0	0	9	4	29	27

bta-miR-376d_MIMAT0010199	29	0	0	0	0	5	0	0
bta-miR-376e_MIMAT0025543	16	0	0	0	0	14	8	0
bta-miR-377_MIMAT0009304	0	0	0	0	4	0	8	0
bta-miR-378b_MIMAT0025535	0	0	0	0	0	0	0	1
bta-miR-378c_MIMAT0025551	0	1	0	0	19	13	7	78
bta-miR-378_MIMAT0009305	0	1	0	1	34	29	22	132
bta-miR-379_MIMAT0009306	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-380-3p_MIMAT0003804	0	0	0	0	5	6	39	0
bta-miR-382_MIMAT0009308	0	0	0	0	4	7	0	26
bta-miR-409a_MIMAT0009310	0	0	0	0	1	0	0	0
bta-miR-411a_MIMAT0009312	32	0	0	36	147	131	118	55
bta-miR-421_MIMAT0009314	1	0	0	0	2	36	13	0
bta-miR-423-3p_MIMAT0003831	0	1	1	0	0	0	0	101
bta-miR-423-5p_MIMAT0012537	46	212	0	0	11	53	17	39
bta-miR-424-3p_MIMAT0015304	0	0	0	0	0	0	1	0
bta-miR-424-5p_MIMAT0013593	0	0	0	0	0	0	0	48
bta-miR-425-3p_MIMAT0003833	144	1	295	88	825	1111	277	524
bta-miR-425-5p_MIMAT0003832	985	837	190	116	1309	2186	6791	1789
bta-miR-429_MIMAT0009315	0	0	22	0	0	2	5	0
bta-miR-431_MIMAT0009316	0	0	0	0	2	0	0	0
bta-miR-449a_MIMAT0009320	1042	225	500	149	2571	2102	4471	3887

bta-miR-449b_MIMAT0009321	0	0	213	0	116	153	180	46
bta-miR-449c_MIMAT0009322	0	0	0	0	0	0	0	7
bta-miR-450a_MIMAT0003834	0	0	0	0	1	0	0	0
bta-miR-451_MIMAT0009323	0	0	1	1	1	0	0	0
bta-miR-452_MIMAT0009324	0	1	0	0	0	0	0	0
bta-miR-454_MIMAT0009326	0	1	17	0	5	11	6	0
bta-miR-455-5p_MIMAT0003835	0	0	0	0	0	1	5	0
bta-miR-483_MIMAT0009327	0	0	1	0	0	0	0	0
bta-miR-484_MIMAT0003535	119	1	0	0	8	3	0	0
bta-miR-487a_MIMAT0003805	0	0	0	0	0	0	4	0
bta-miR-487b_MIMAT0003847	0	0	0	0	5	0	0	0
bta-miR-497_MIMAT0004343	0	0	38	0	1	1	0	0
bta-miR-499_MIMAT0003536	0	0	0	0	4	3	4	13
bta-miR-502a_MIMAT0009338	0	0	0	0	0	0	0	20
bta-miR-502b_MIMAT0009339	0	0	0	0	0	6	1	0
bta-miR-532_MIMAT0003848	0	0	0	0	0	9	0	0
bta-miR-539_MIMAT0009342	0	0	12	0	0	0	15	0
bta-miR-543_MIMAT0009344	0	0	0	0	2	0	0	0
bta-miR-545-3p_MIMAT0003807	0	0	0	0	0	6	0	0
bta-miR-545-5p_MIMAT0003806	0	0	1	0	5	10	24	0
bta-miR-574_MIMAT0024577	0	0	0	0	0	1	4	47

bta-miR-6119-5p_MIMAT0024588	9	0	6	0	20	43	54	8
bta-miR-6120-3p_MIMAT0024591	0	0	0	0	28	21	94	0
bta-miR-6123_MIMAT0024596	0	0	0	0	3	16	15	18
bta-miR-6522_MIMAT0025540	12	0	0	0	61	23	11	87
bta-miR-6526_MIMAT0025556	2354	0	222	37	581	2929	3961	1519
bta-miR-6528_MIMAT0025562	0	0	0	0	0	7	0	0
bta-miR-6529a_MIMAT0025565	161	0	0	42	178	85	20	128
bta-miR-652_MIMAT0024578	0	0	0	0	0	6	0	0
bta-miR-6534_MIMAT0025570	0	0	0	0	3	0	5	0
bta-miR-6536_MIMAT0025572	0	0	0	0	1	0	0	0
bta-miR-660_MIMAT0004344	49	0	0	0	60	113	185	80
bta-miR-708_MIMAT0009367	0	0	0	0	1	0	0	84
bta-miR-760-3p_MIMAT0022951	0	0	0	0	0	5	0	0
bta-miR-767_MIMAT0009375	28	0	0	0	0	5	6	0
bta-miR-769_MIMAT0009376	0	0	0	0	0	10	7	0
bta-miR-7857-5p_MIMAT0030432	0	0	17	0	5	31	20	11
bta-miR-7859_MIMAT0030434	50	0	17	28	101	285	331	230
bta-miR-7861_MIMAT0030441	0	0	0	0	0	0	1	0
bta-miR-7865_MIMAT0030450	0	0	0	0	0	1	0	0
bta-miR-7_MIMAT0003843	557	1	203	65	711	1596	609	1686
bta-miR-873_MIMAT0009377	0	0	0	0	0	4	9	0

bta-miR-876_MIMAT0009380	0	0	0	0	3	0	0	0
bta-miR-885_MIMAT0009382	0	0	0	0	0	0	0	28
bta-miR-92a_MIMAT0009383	0	0	0	4	0	2	0	0
bta-miR-92b_MIMAT0009384	1	0	0	90	0	7	0	32
bta-miR-935_MIMAT0009385	0	0	0	0	0	5	0	0
bta-miR-93_MIMAT0003837	3047	781	462	755	3958	6636	21692	4396
bta-miR-9-3p_MIMAT0012549	5	0	0	0	32	58	49	53
bta-miR-95_MIMAT0009387	0	1	0	0	7	10	18	0
bta-miR-96_MIMAT0009388	0	0	0	0	1	0	0	0
bta-miR-98_MIMAT0003809	0	1	0	1	4	5	92	39
bta-miR-99-a-3p_MIMAT0012533	0	0	0	0	2	16	61	0
bta-miR-99-a-5p_MIMAT0003537	81	16	27	99	485	304	1858	723
bta-miR-99b_MIMAT0004345	55	0	0	0	1	8	0	0
Total de reads da amostra	52053	49223	22612	16418	112260	173937	304941	170720

ANEXO 2

Quadro com todas os microRNAs espermáticos nas amostras de cada touro e a porcentagem de reads mensurada em cada amostra (total e em cada touro)

PORCENTAGEM DE READS POR AMOSTRA

microRNAs	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Touro 4	Touro 5	Touro 6	Touro 7	Touro 8
bta-let-7-a-3p_MIMAT0004330	0	0	0	0	0,004454	0,004024	0	0
bta-let-7-a-5p_MIMAT0003844	2,72991	12,73998	3,294711	9,215495	3,648673	3,632925	2,043346	4,357427
bta-let-7b_MIMAT0004331	0,66663	5,513683	0,977357	1,614082	0,603064	0,61344	0,136092	1,213097
bta-let-7c_MIMAT0004332	0,21324	0,668387	0,035379	0,785723	0,068591	0,066691	0,017052	0,241917
bta-let-7d_MIMAT0003810	0,11527	0,471324	0,260923	0,012182	0,104222	0,147755	0,039352	0,100164
bta-let-7e_MIMAT0004333	0,02497	0,526177	0,057492	0,042636	0,038304	0,022422	0,006559	0,106022
bta-let-7f_MIMAT0003519	0,47836	4,408508	0,65452	2,935802	0,223588	0,210996	0,202662	0,381326
bta-let-7g_MIMAT0003838	0,51294	1,186437	0,29188	0,889268	0,46321	0,471435	0,4837	0,656045
bta-let-7i_MIMAT0003851	0,50141	0	0,101716	0,012182	0,102441	0,082789	0,048534	0,220244
bta-miR-10020_MIMAT0040419	0	0	0	0	0	0	0,003279	0
bta-miR-100_MIMAT0009215	5,04294	1,950308	4,696621	1,24863	6,498308	5,547411	17,3627	4,625117
bta-miR-10167-3p_MIMAT0040914	0	0	0,004422	0	0,000891	0,027021	0,00951	0,01523
bta-miR-10172-5p_MIMAT0040920	0	0	0	0	0	0,001725	0	0
bta-miR-10174-3p_MIMAT0040928	0,12295	1,52571	0,084026	0,444634	0,054338	0,015523	0,025579	0,064433
bta-miR-10183-5p_MIMAT0040942	0	0	0	0	0,001782	0,002875	0	0

bta-miR-10185-5p_MIMAT0040944	0,00576	0	0	0	0	0	0	0
bta-miR-101_MIMAT0003520	0,00192	0	0,101716	0	0,052557	0,052318	0,07936	0,04276
bta-miR-103_MIMAT0003521	0,51486	0,004063	0,393596	1,236448	0,250312	0,293785	0,376466	0,556467
bta-miR-106a_MIMAT0003784	0	0	0,641252	0	0,114021	0,159828	0,067882	0,021087
bta-miR-106b_MIMAT0009218	0,37462	0,268167	1,60092	0,182726	0,741137	0,90895	1,446837	0,895033
bta-miR-107_MIMAT0003785	0,12103	0	0,322837	0,018273	0,0677	0,039095	0,037712	0,079077
bta-miR-10a_MIMAT0003786	0	0	0,14594	0	0,005345	0,004024	0,022627	0,006443
bta-miR-10b_MIMAT0003839	0	0	0	0	0,004454	0,00345	0,002296	0
bta-miR-11971_MIMAT0046336	0,00192	0	0	0	0	0	0	0
bta-miR-11972_MIMAT0046341	0,00192	0	0,026535	0	0,009799	0,010923	0,000984	0,007615
bta-miR-11975_MIMAT0046354	0,15753	0,182841	1,813197	3,465708	0,623552	0,97794	0,206597	0,565253
bta-miR-11976_MIMAT0046357	0,15753	0,182841	1,813197	3,465708	0,623552	0,97794	0,206597	0,565253
bta-miR-11980_MIMAT0046368	0,03458	0	0,088449	0	0	0,001725	0	0
bta-miR-11986b_MIMAT0046621	0	0	0	0	0,001782	0	0	0
bta-miR-11987_MIMAT0046387	0,04034	0	0	0	0,027614	0,022997	0,038368	0,025773
bta-miR-11988_MIMAT0046393	0	0	0	0	0	0,011498	0,013773	0
bta-miR-11995_MIMAT0046648	0	0	0	0	0	0	0,000656	0
bta-miR-12023_MIMAT0046716	0	0	0	0	0	0	0	0,000586
bta-miR-12030_MIMAT0046723	0,00384	0,004063	0	0,012182	0,001782	0,0023	0,000984	0,001172
bta-miR-12034_MIMAT0046727	0,00192	0	0	0	0,006236	0,008049	0	0
bta-miR-12056_MIMAT0046763	0	0	0	0	0	0,009774	0	0,000586

bta-miR-135a_MIMAT0009228	0	0	0	0	0,006236	0,008049	0,009182	0
bta-miR-135b_MIMAT0009229	0	0	0	0	0,001782	0	0	0
bta-miR-136_MIMAT0009230	0	0	0	0	0,014253	0	0,003279	0,012301
bta-miR-137_MIMAT0009231	0	0,004063	0	0	0,008017	0,010923	0,008526	0
bta-miR-1388-5p_MIMAT0013590	0	0	0	0	0,007126	0,000575	0	0,007615
bta-miR-138_MIMAT0003813	0	0	0	0	0	0,009774	0,002623	0
bta-miR-139_MIMAT0003788	0,3362	0,002032	0,243234	0	0,12471	0,050593	0,119695	0,028702
bta-miR-140_MIMAT0003789	0	0	0,044224	0	0,127383	0,066116	0,070178	0,053889
bta-miR-141_MIMAT0009232	0,25743	2,880767	0,561649	1,25472	0,049884	0,03507	0,03968	0,096649
bta-miR-142-3p_MIMAT0003791	0	0	0	0	0	0,00115	0	0
bta-miR-142-5p_MIMAT0003790	0	0	0	0,310635	0,016034	0,006899	0,008854	0,005858
bta-miR-143_MIMAT0009233	0,07877	0	0,004422	0,316726	0,01158	0,017823	0,01115	0,185098
bta-miR-145_MIMAT0003542	0	0	0	0	0,008017	0	0	0,043932
bta-miR-146a_MIMAT0009236	1,48502	1,438352	3,922696	2,174443	8,246036	9,692015	4,388718	5,909677
bta-miR-146b_MIMAT0009235	0,05187	0	0,088449	0,024364	0,269909	0,233418	0,208893	0,198571
bta-miR-147_MIMAT0009237	0	0	0	0	0	0,004024	0,003279	0
bta-miR-148a_MIMAT0003522	0	0	0,022112	0	0,002672	0,000575	0,00164	0
bta-miR-148b_MIMAT0003814	0,00768	0	0	0	0,005345	0,008624	0,00951	0,009958
bta-miR-150_MIMAT0003845	0	0	0	0	0,000891	0,006899	0,00164	0
bta-miR-151-3p_MIMAT0003524	0,08837	0	0	0	0,086407	0,098311	0,146914	0,079077
bta-miR-151-5p_MIMAT0003523	4,78935	2,506958	4,29418	1,315629	5,003563	5,671594	3,47641	3,767573

bta-miR-152_MIMAT0009238	0	0	0	0	0,008017	0,013223	0,007215	0
bta-miR-153_MIMAT0009239	0,01345	0	0,132673	0	0,040976	0,031621	0,025251	0,056232
bta-miR-154a_MIMAT0009240	0	0	0	0	0,003563	0	0	0
bta-miR-154c_MIMAT0025542	0	0	0	0	0,002672	0	0,004919	0
bta-miR-155_MIMAT0009241	0	0	0	0	0	0,000575	0,001312	0
bta-miR-1584-5p_MIMAT0011969	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-15a_MIMAT0004334	0,20748	0,002032	0,322837	1,358265	0,14698	0,105211	0,165934	0,131209
bta-miR-15b_MIMAT0003792	0,63973	0	0,530692	0,663905	0,466774	0,306433	0,267593	0,548266
bta-miR-16a_MIMAT0009242	5,89015	0,605408	3,502565	0,194908	7,156601	4,789665	6,24547	6,648313
bta-miR-16b_MIMAT0003525	12,5756	5,966723	8,079781	6,620782	12,17976	8,394419	8,162891	10,80131
bta-miR-17-3p_MIMAT0003816	0	0	0	0	0,076608	0,053468	0,097724	0,026359
bta-miR-17-5p_MIMAT0003815	0,56481	0	0,707589	0,012182	0,53002	0,620914	0,681771	0,417643
bta-miR-1777a_MIMAT0012032	0,19211	0	0,49089	2,399805	0,077499	0,043119	0,011806	0,025187
bta-miR-1777b_MIMAT0012046	0,11142	0	0,398019	2,36326	0,048103	0,045994	0,011806	0,025187
bta-miR-181a_MIMAT0003543	0	0	0	0	0,012471	0,00345	0,003279	0,082006
bta-miR-181b_MIMAT0003793	0	0	0	0	0,016925	0	0	0
bta-miR-181c_MIMAT0003817	0,08645	0	0	0	0,035632	0,012648	0,01115	0
bta-miR-181d_MIMAT0009243	0,0365	0	0	0,006091	0,007126	0,009199	0	0
bta-miR-182_MIMAT0009244	0	0	0	0	0,005345	0,006899	0	0
bta-miR-1839_MIMAT0009968	0,12487	0,002032	0	0	0,084625	0,140281	0,058372	0,071462
bta-miR-183_MIMAT0009245	0	0,002032	0,044224	0	0,000891	0	0	0

bta-miR-184_MIMAT0009246	0	0	0	0	0,023161	0,007474	0	0,014058
bta-miR-185_MIMAT0009247	0,13256	0,780123	0,229966	0	0,095314	0,064966	0,016397	0,067948
bta-miR-186_MIMAT0003818	0,64357	0	1,074651	1,419174	0,583467	0,72325	1,066764	0,855787
bta-miR-18a_MIMAT0003526	0,4092	0,635882	1,114453	0,444634	0,535364	0,854332	1,121528	0,466261
bta-miR-18b_MIMAT0003517	0,00768	0,016253	0,229966	0	0,038304	0,053468	0,107234	0,022844
bta-miR-190a_MIMAT0009251	0,02305	0	0,004422	0	0,005345	0,005749	0,004263	0,005272
bta-miR-190b_MIMAT0009252	0,03074	0,002032	0,061914	0	0,089079	0,059217	0,081327	0,021673
bta-miR-191_MIMAT0003819	13,6207	11,53119	10,77304	6,017785	10,46766	13,75613	12,04659	13,98137
bta-miR-192_MIMAT0003820	0	0	0	0,322816	0,009799	0	0,012133	0,021087
bta-miR-193-a-3p_MIMAT0003795	0	0	0,004422	0	0	0,004599	0	0
bta-miR-193b_MIMAT0009253	0	0	0	0	0	0	0,002296	0
bta-miR-194_MIMAT0009254	0	0	0	0	0,001782	0,000575	0,006231	0,000586
bta-miR-195_MIMAT0004335	0,2459	0	0	0,188817	0,085516	0,040244	0,053781	0,14351
bta-miR-196a_MIMAT0009255	0	0	0	0,322816	0,089079	0,060367	0,127894	0,076148
bta-miR-196b_MIMAT0009256	0	0	0	0	0	0	0	0,018744
bta-miR-197_MIMAT0009257	0	0	0	0	0	0	0	0,014644
bta-miR-199-a-3p_MIMAT0003746	0	0	0	0	0,001782	0,008624	0,003935	0,025773
bta-miR-199c_MIMAT0011871	0	0	0	0	0,001782	0,008624	0,003935	0,025773
bta-miR-19a_MIMAT0004336	0	0	0,01769	0	0,017816	0,025297	0,009838	0,041003
bta-miR-19b_MIMAT0004337	0,0269	0	0,061914	0	0,040976	0,065541	0,035089	0,050375
bta-miR-1_MIMAT0009214	0,00576	0	0	0	0	0,00115	0	0,119494

bta-miR-200a_MIMAT0003822	0,11335	0,008126	0,424553	0,006091	0,057901	0,035645	0,074769	0,049203
bta-miR-200b_MIMAT0003842	0,0269	0,49164	0	0	0,154107	0,079914	0,140683	0,070876
bta-miR-200c_MIMAT0003823	0,00192	0,587124	0,265346	0,48727	0,003563	0,0023	0,003279	0,030459
bta-miR-202_MIMAT0009259	0	0	0	0	0	0,00345	0	0
bta-miR-204_MIMAT0004338	0,05187	0	0,114983	0	0,281489	0,223069	0,28858	0,236645
bta-miR-205_MIMAT0003545	0	0,002032	0,057492	0,006091	0	0,0023	0,004919	0
bta-miR-20a_MIMAT0003527	0,99898	0,49164	1,251548	0,365453	0,988776	1,213658	1,669831	0,790183
bta-miR-20b_MIMAT0003796	0,00576	0	0,008845	0	0,008908	0,012073	0,010494	0,005272
bta-miR-210_MIMAT0003824	0	0	0,123828	0	0	0	0	0
bta-miR-211_MIMAT0009263	0,00192	0	0	0	0	0,004024	0,003279	0
bta-miR-212_MIMAT0009264	0	0	0	0	0	0	0	0,004686
bta-miR-215_MIMAT0003797	0	0	0	0,304544	0	0,004024	0	0
bta-miR-21-5p_MIMAT0003528	4,72211	8,554944	5,38652	6,81569	4,29984	4,156677	6,647187	3,456537
bta-miR-216b_MIMAT0009266	0	0	0	0	0,000891	0,000575	0,00951	0
bta-miR-217_MIMAT0009267	0	0,008126	0	0	0,002672	0,013223	0,017052	0
bta-miR-219-3p_MIMAT0012547	0	0	0	0	0	0	0,00164	0
bta-miR-221_MIMAT0003529	0,04995	0	0	0,395907	0,000891	0	0,008526	0,002929
bta-miR-222_MIMAT0003530	0	0,778092	0,004422	0,006091	0,001782	0,005749	0,000328	0
bta-miR-223_MIMAT0009270	0,0999	0,327083	0,035379	0,012182	0,000891	0,004599	0,006231	0,06209
bta-miR-22-3p_MIMAT0012536	0,98553	0,071105	1,78224	2,99062	1,012827	1,046356	0,919522	1,156279
bta-miR-224_MIMAT0009271	0	0	0	0	0,000891	0	0,006559	0

bta-miR-22-5p_MIMAT0003826	0	0	0	0	0	0,000575	0,000984	0
bta-miR-2284aa_MIMAT0025560	0,1095	0	0,207854	0,036545	0,052557	0,083364	0,086246	0,063847
bta-miR-2284a_MIMAT0011906	0	0	0	0	0	0	0,000328	0
bta-miR-2284b_MIMAT0011983	0	0	0	0	0	0	0	0,000586
bta-miR-2284c_MIMAT0011926	0	0	0	0	0,000891	0,0023	0,002951	0
bta-miR-2284d_MIMAT0011836	0	0	0	0	0	0,000575	0,000328	0
bta-miR-2284e_MIMAT0012080	0	0	0	0	0,000891	0	0	0
bta-miR-2284-h-5p_MIMAT0012019	0	0,002032	0,008845	0	0,003563	0,006899	0,000984	0,018158
bta-miR-2284k_MIMAT0011907	0,38614	0	0,504157	0,091363	0,362551	0,415093	0,43779	0,459817
bta-miR-2284l_MIMAT0011824	0	0	0	0	0,000891	0,008049	0,00164	0,003515
bta-miR-2284m_MIMAT0011976	0,15945	0	0,194587	0,048727	0,179939	0,220195	0,234472	0,200914
bta-miR-2284o_MIMAT0012068	0	0	0	0	0,000891	0	0	0
bta-miR-2284p_MIMAT0011885	0	0	0	0	0	0	0	0,004686
bta-miR-2284q_MIMAT0011957	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-2284v_MIMAT0011937	0	0	0	0	0	0	0,000984	0
bta-miR-2284x_MIMAT0017395	1,25641	0	1,711481	0,493361	1,214146	1,239529	1,262211	1,574508
bta-miR-2284y_MIMAT0024579	0,40728	0,002032	0,535114	0,091363	0,388384	0,440964	0,465664	0,503749
bta-miR-2284z_MIMAT0025559	0,1095	0	0,207854	0,036545	0,052557	0,083364	0,08559	0,063847
bta-miR-2285aa_MIMAT0030435	0	0	0	0	0	0,0023	0	0
bta-miR-2285ac_MIMAT0030440	0	0	0	0	0	0,000575	0,000656	0,000586
bta-miR-2285ad_MIMAT0030446	0	0	0	0	0	0,0023	0	0

bta-miR-2285aj-5p_MIMAT0040947	0,00192	0	0,004422	0	0,002672	0,005749	0,005247	0,001757
bta-miR-2285al-5p_MIMAT0040949	0	0	0	0	0,004454	0,00345	0,004263	0
bta-miR-2285ap_MIMAT0046362	0	0	0	0	0	0,0023	0	0
bta-miR-2285at_MIMAT0046342	0	0	0	0	0	0	0,000328	0
bta-miR-2285au_MIMAT0046346	0,01345	0	0	0	0,005345	0,010349	0,007542	0,009958
bta-miR-2285av_MIMAT0046347	0,40728	0,002032	0,535114	0,091363	0,388384	0,440964	0,465664	0,503749
bta-miR-2285aw_MIMAT0046348	0	0	0	0	0,000891	0,000575	0	0,001757
bta-miR-2285ba_MIMAT0046373	0	0	0	0	0	0	0,000656	0
bta-miR-2285bf_MIMAT0046382	1,49847	0,617597	1,795507	1,175539	1,346873	1,253327	0,446316	1,91776
bta-miR-2285bg_MIMAT0046386	0	0	0	0	0	0,0023	0,000984	0
bta-miR-2285bl_MIMAT0046623	0	0	0	0	0,002672	0	0,001312	0
bta-miR-2285b_MIMAT0011833	0,0269	0	0	0	0,031178	0,03737	0,028858	0,046275
bta-miR-2285bo_MIMAT0046627	0	0	0	0,006091	0	0	0,000328	0
bta-miR-2285bp_MIMAT0046633	0	0	0	0	0,003563	0	0,001968	0
bta-miR-2285bq_MIMAT0046635	0	0	0	0	0	0,0023	0	0
bta-miR-2285bw_MIMAT0046643	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-2285bz_MIMAT0046646	0	0	0	0	0	0	0	0,000586
bta-miR-2285cf_MIMAT0046663	0	0	0	0	0,001782	0,00115	0,000328	0,008786
bta-miR-2285cl_MIMAT0046681	0	0	0	0	0	0	0	0,001757
bta-miR-2285cm_MIMAT0046682	0	0	0	0	0,000891	0,000575	0	0,001757
bta-miR-2285co_MIMAT0046686	0	0	0	0	0,002672	0	0,001312	0

bta-miR-2285cp_MIMAT0046687	0	0	0	0	0,000891	0,000575	0,00164	0
bta-miR-2285cu_MIMAT0046698	0	0	0	0	0	0	0,000328	0,001172
bta-miR-2285e_MIMAT0024580	0	0	0	0	0	0	0,000328	0
bta-miR-2285f_MIMAT0024581	0	0	0	0,073091	0,005345	0,004024	0,002623	0
bta-miR-2285i_MIMAT0024584	0	0	0,013267	0	0,002672	0,00115	0	0,000586
bta-miR-2285j_MIMAT0024585	0	0	0	0	0,003563	0,00345	0,000328	0,010544
bta-miR-2285k_MIMAT0024586	0	0	0	0	0,004454	0,0023	0,001312	0
bta-miR-2285l_MIMAT0024587	0	0	0	0	0	0,0023	0	0
bta-miR-2285m_MIMAT0025533	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-2285n_MIMAT0025531	0	0	0	0	0	0,0023	0,000328	0
bta-miR-2285q_MIMAT0025574	0	0	0	0	0	0	0,00164	0
bta-miR-2285u_MIMAT0031094	0	0	0	0	0	0,0023	0,000984	0
bta-miR-2285v_MIMAT0025579	0	0	0	0	0	0,00115	0	0
bta-miR-2299-3p_MIMAT0011808	0	0	0	0	0,002672	0	0	0
bta-miR-2299-5p_MIMAT0011807	0	0	0	0	0,001782	0	0	0
bta-miR-2305_MIMAT0011817	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-2320-3p_MIMAT0011845	0	0	0	0	0,000891	0,002875	0,00787	0
bta-miR-2336_MIMAT0011869	0	0	0	0	0	0,013223	0,003279	0
bta-miR-2342_MIMAT0011877	0	0	0	0	0	0,004599	0,000656	0
bta-miR-2346_MIMAT0011881	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-2363_MIMAT0011901	0	0	0	0	0	0,000575	0	0

bta-miR-2367-3p_MIMAT0011910	0	0	0	0	0	0,00115	0	0
bta-miR-2367-5p_MIMAT0011909	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-2397-3p_MIMAT0011952	0	0	0	0	0	0	0,00164	0
bta-miR-2399-3p_MIMAT0011955	0	0	0	0	0	0	0,001312	0,007029
bta-miR-23a_MIMAT0003827	0,30354	2,899051	0	0	0,411545	0,208121	0,342689	0,498477
bta-miR-23-b-3p_MIMAT0003852	0,12295	1,52571	0,084026	0,444634	0,054338	0,015523	0,025579	0,064433
bta-miR-2419-5p_MIMAT0011985	0	0	0	0	0,009799	0,006899	0,017052	0
bta-miR-2435_MIMAT0012007	0	0	0	0	0,004454	0,004024	0,008198	0,025773
bta-miR-24-3p_MIMAT0003840	0,25359	1,194564	0	0,006091	0,027614	0,016098	0,015085	0,072634
bta-miR-2453_MIMAT0012034	0	0	0	0	0	0,000575	0,000328	0
bta-miR-2463_MIMAT0012050	0	0	0	0	0	0,0023	0	0
bta-miR-2468_MIMAT0012058	0	0	0	0	0,010689	0,015523	0,006231	0
bta-miR-2478_MIMAT0012070	0	0	0	0	0	0,010923	0	0
bta-miR-2483-3p_MIMAT0012076	0	0	0	0	0	0,004599	0,007215	0,015815
bta-miR-2483-5p_MIMAT0012075	0	0	0	0	0,005345	0	0	0,029873
bta-miR-2484_MIMAT0012077	0	0	0	0	0,008017	0	0	0
bta-miR-24_MIMAT0009250	0,05187	0	0	0	0,005345	0,008049	0,013117	0,041589
bta-miR-25_MIMAT0003853	0,08837	0	0,061914	1,748081	0,271691	0,171326	0,374171	0,142338
bta-miR-26a_MIMAT0003516	1,38897	5,53603	1,180789	2,253624	1,622127	1,618977	1,568828	1,651242
bta-miR-26b_MIMAT0003531	0,09798	2,571968	0,097293	0,456816	0,049884	0,039095	0,010166	0,111293
bta-miR-27-a-3p_MIMAT0003532	0,58594	0,231599	0,517424	0,584724	0,604846	0,83421	0,643731	0,803655

bta-miR-27b_MIMAT0003546	0,16906	0,002032	0,203432	0,018273	0,161233	0,154079	0,158391	0,298149
bta-miR-2881_MIMAT0013839	0	0	0	0	0,002672	0,004599	0,000656	0
bta-miR-2885_MIMAT0013843	0	0	0,150363	0	0,060574	0,041969	0,073457	0,02343
bta-miR-2887_MIMAT0013845	0,22669	0,532271	0,349372	1,784627	0,353643	0,232843	0,124614	0,154639
bta-miR-28_MIMAT0009272	0,12295	0	0	1,120721	0,080171	0,03277	0,03017	0,036903
bta-miR-2904_MIMAT0013862	0,27664	0,231599	0,168052	0	0,12471	0,217895	0,103627	0,070291
bta-miR-296-3p_MIMAT0009273	0	0	0	0	0,009799	0,007474	0,001312	0
bta-miR-296-5p_MIMAT0026918	0,23822	0	0	0	0,114021	0,061517	0,111497	0,084934
bta-miR-29a_MIMAT0003518	0,61668	1,198627	0,274191	1,291266	0,245858	0,304133	0,381385	0,49672
bta-miR-29b_MIMAT0003828	0,07684	0,930459	0,119406	0,359362	0,076608	0,085088	0,025907	0,099578
bta-miR-29c_MIMAT0003829	0,00384	1,992971	0,190165	1,272993	0,092642	0,048293	0,093789	0,041589
bta-miR-29-d-3p_MIMAT0009275	0	0	0	0	0,003563	0	0	0
bta-miR-29-d-5p_MIMAT0026919	0	0	0	0	0,006236	0,009199	0,010166	0
bta-miR-29e_MIMAT0009953	0	0	0,01769	0	0	0	0	0
bta-miR-301a_MIMAT0009276	0	0	0	0	0,009799	0,008049	0,000656	0,021673
bta-miR-301b_MIMAT0009277	0	0	0	0	0,004454	0	0	0
bta-miR-302b_MIMAT0009280	0	0	0	0	0	0	0	0,014058
bta-miR-302d_MIMAT0009279	0	0	0	0	0	0,000575	0	0,014058
bta-miR-30-a-5p_MIMAT0003841	0,04995	0	0,101716	0	0,046321	0,10636	0,094117	0,084349
bta-miR-30-b-3p_MIMAT0012534	0,06148	0	0	0	0	0	0	0
bta-miR-30-b-5p_MIMAT0003547	0	0	0	0	0,031178	0,047718	0,047878	0,054475

bta-miR-30c_MIMAT0003850	0	0	0	0	0,000891	0,001725	0,000984	0,020501
bta-miR-30d_MIMAT0003533	0,31122	0	0,437821	0,298453	0,442722	0,416818	0,58208	0,396556
bta-miR-30-e-5p_MIMAT0003799	0,16522	0,148305	0,681054	0,024364	0,269909	0,216745	0,310224	0,232545
bta-miR-30f_MIMAT0009282	0	0	0	0	0	0,002875	0	0
bta-miR-3141_MIMAT0024573	0	0	0	0	0	0,021272	0,017708	0,022844
bta-miR-31_MIMAT0003548	0,073	0,186904	0,243234	1,419174	0,021379	0,010923	0,023611	0,024602
bta-miR-320a_MIMAT0003534	0,06532	0,160494	0,008845	0,359362	0,014253	0,013223	0,00951	0,013472
bta-miR-323_MIMAT0009284	0	0	0	0	0,012471	0,008049	0,024923	0
bta-miR-324_MIMAT0009285	0	0	0	0	0,002672	0,020697	0,005903	0,012301
bta-miR-32_MIMAT0009283	0,04034	0	0	0	0,047212	0,022422	0,06657	0,037488
bta-miR-331-3p_MIMAT0004339	0	0	0	0	0	0,004024	0	0,000586
bta-miR-331-5p_MIMAT0026716	0	0	0,004422	0	0	0	0	0
bta-miR-335_MIMAT0009291	1,06814	0,085326	1,516894	0,90145	1,048459	1,595405	0,785726	1,742619
bta-miR-338_MIMAT0009292	0	0	0	0	0,001782	0	0,001312	0,009958
bta-miR-339a_MIMAT0009293	0	0	0,044224	0	0,007126	0,014948	0,010166	0,026359
bta-miR-339b_MIMAT0012038	0	0	0,044224	0	0,007126	0,014948	0,010166	0,026359
bta-miR-33a_MIMAT0009294	0	0	0	0,006091	0	0	0	0
bta-miR-340_MIMAT0009296	0	0	0	0	0,001782	0,0023	0,000328	0
bta-miR-342_MIMAT0003846	0	0	0	0	0	0,005749	0,008854	0,032802
bta-miR-3431_MIMAT0017394	0	0	0	0	0	0,013798	0,013117	0
bta-miR-3432a_MIMAT0017396	0,77613	0	0,411286	1,157266	1,300552	1,319443	0,769001	1,08306

bta-miR-378c_MIMAT0025551	0	0,002032	0	0	0,016925	0,007474	0,002296	0,045689
bta-miR-378_MIMAT0009305	0	0,002032	0	0,006091	0,030287	0,016673	0,007215	0,07732
bta-miR-379_MIMAT0009306	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-380-3p_MIMAT0003804	0	0	0	0	0,004454	0,00345	0,012789	0
bta-miR-382_MIMAT0009308	0	0	0	0	0,003563	0,004024	0	0,01523
bta-miR-409a_MIMAT0009310	0	0	0	0	0,000891	0	0	0
bta-miR-411a_MIMAT0009312	0,06148	0	0	0,219272	0,130946	0,075315	0,038696	0,032216
bta-miR-421_MIMAT0009314	0,00192	0	0	0	0,001782	0,020697	0,004263	0
bta-miR-423-3p_MIMAT0003831	0	0,002032	0,004422	0	0	0	0	0,059161
bta-miR-423-5p_MIMAT0012537	0,08837	0,430693	0	0	0,009799	0,030471	0,005575	0,022844
bta-miR-424-3p_MIMAT0015304	0	0	0	0	0	0	0,000328	0
bta-miR-424-5p_MIMAT0013593	0	0	0	0	0	0	0	0,028116
bta-miR-425-3p_MIMAT0003833	0,27664	0,002032	1,304617	0,535997	0,734901	0,638737	0,090837	0,306935
bta-miR-425-5p_MIMAT0003832	1,8923	1,700425	0,840262	0,706542	1,166043	1,256777	2,226988	1,047915
bta-miR-429_MIMAT0009315	0	0	0,097293	0	0	0,00115	0,00164	0
bta-miR-431_MIMAT0009316	0	0	0	0	0,001782	0	0	0
bta-miR-449a_MIMAT0009320	2,00181	0,457103	2,211215	0,907541	2,290219	1,208484	1,466185	2,276828
bta-miR-449b_MIMAT0009321	0	0	0,941978	0	0,103332	0,087963	0,059028	0,026945
bta-miR-449c_MIMAT0009322	0	0	0	0	0	0	0	0,0041
bta-miR-450a_MIMAT0003834	0	0	0	0	0,000891	0	0	0
bta-miR-451_MIMAT0009323	0	0	0,004422	0,006091	0,000891	0	0	0

bta-miR-452_MIMAT0009324	0	0,002032	0	0	0	0	0	0
bta-miR-454_MIMAT0009326	0	0,002032	0,075181	0	0,004454	0,006324	0,001968	0
bta-miR-455-5p_MIMAT0003835	0	0	0	0	0	0,000575	0,00164	0
bta-miR-483_MIMAT0009327	0	0	0,004422	0	0	0	0	0
bta-miR-484_MIMAT0003535	0,22861	0,002032	0	0	0,007126	0,001725	0	0
bta-miR-487a_MIMAT0003805	0	0	0	0	0	0	0,001312	0
bta-miR-487b_MIMAT0003847	0	0	0	0	0,004454	0	0	0
bta-miR-497_MIMAT0004343	0	0	0,168052	0	0,000891	0,000575	0	0
bta-miR-499_MIMAT0003536	0	0	0	0	0,003563	0,001725	0,001312	0,007615
bta-miR-502a_MIMAT0009338	0	0	0	0	0	0	0	0,011715
bta-miR-502b_MIMAT0009339	0	0	0	0	0	0,00345	0,000328	0
bta-miR-532_MIMAT0003848	0	0	0	0	0	0,005174	0	0
bta-miR-539_MIMAT0009342	0	0	0,053069	0	0	0	0,004919	0
bta-miR-543_MIMAT0009344	0	0	0	0	0,001782	0	0	0
bta-miR-545-3p_MIMAT0003807	0	0	0	0	0	0,00345	0	0
bta-miR-545-5p_MIMAT0003806	0	0	0,004422	0	0,004454	0,005749	0,00787	0
bta-miR-574_MIMAT0024577	0	0	0	0	0	0,000575	0,001312	0,02753
bta-miR-6119-5p_MIMAT0024588	0,01729	0	0,026535	0	0,017816	0,024722	0,017708	0,004686
bta-miR-6120-3p_MIMAT0024591	0	0	0	0	0,024942	0,012073	0,030826	0
bta-miR-6123_MIMAT0024596	0	0	0	0	0,002672	0,009199	0,004919	0,010544
bta-miR-6522_MIMAT0025540	0,02305	0	0	0	0,054338	0,013223	0,003607	0,050961

bta-miR-6526_MIMAT0025556	4,52231	0	0,98178	0,225362	0,517549	1,683943	1,29894	0,889761
bta-miR-6528_MIMAT0025562	0	0	0	0	0	0,004024	0	0
bta-miR-6529a_MIMAT0025565	0,3093	0	0	0,255817	0,15856	0,048868	0,006559	0,074977
bta-miR-652_MIMAT0024578	0	0	0	0	0	0,00345	0	0
bta-miR-6534_MIMAT0025570	0	0	0	0	0,002672	0	0,00164	0
bta-miR-6536_MIMAT0025572	0	0	0	0	0,000891	0	0	0
bta-miR-660_MIMAT0004344	0,09413	0	0	0	0,053447	0,064966	0,060667	0,04686
bta-miR-708_MIMAT0009367	0	0	0	0	0,000891	0	0	0,049203
bta-miR-760-3p_MIMAT0022951	0	0	0	0	0	0,002875	0	0
bta-miR-767_MIMAT0009375	0,05379	0	0	0	0	0,002875	0,001968	0
bta-miR-769_MIMAT0009376	0	0	0	0	0	0,005749	0,002296	0
bta-miR-7857-5p_MIMAT0030432	0	0	0,075181	0	0,004454	0,017823	0,006559	0,006443
bta-miR-7859_MIMAT0030434	0,09606	0	0,075181	0,170545	0,08997	0,163852	0,108546	0,134724
bta-miR-7861_MIMAT0030441	0	0	0	0	0	0	0,000328	0
bta-miR-7865_MIMAT0030450	0	0	0	0	0	0,000575	0	0
bta-miR-7_MIMAT0003843	1,07006	0,002032	0,897753	0,395907	0,633351	0,917574	0,199711	0,987582
bta-miR-873_MIMAT0009377	0	0	0	0	0	0,0023	0,002951	0
bta-miR-876_MIMAT0009380	0	0	0	0	0,002672	0	0	0
bta-miR-885_MIMAT0009382	0	0	0	0	0	0	0	0,016401
bta-miR-92a_MIMAT0009383	0	0	0	0,024364	0	0,00115	0	0
bta-miR-92b_MIMAT0009384	0,00192	0	0	0,548179	0	0,004024	0	0,018744

