

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Efeito da maturação epididimária no conteúdo de micro-RNAs em espermatozoides
bovinos**

Ana Luiza Ferreira Chieregato

Uberlândia - MG
Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito da maturação epididimária no conteúdo de micro-RNAs em espermatozoides bovinos

Ana Luiza Ferreira Chieregato

Orientador: Marcelo Emilio Beletti

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Efeito da maturação epididimária no conteúdo de micro-RNAs em espermatozoides
bovinos**

Ana Luiza Ferreira Chierigato

Marcelo Emilio Beletti
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação
do Curso de Biotecnologia em

Coordenador: Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia - MG
Novembro – 2021

RESUMO

Os micro-RNAs (miRNAs) são uma classe de pequenas moléculas RNAs não codificantes de proteínas que atuam no processo regulatório de diversos eventos biológicos, como a espermatogênese. Com isso, acredita-se que essas moléculas possuem relação com o desenvolvimento embrionário, sendo importantes para estudos de fertilidade em touros. No presente estudo, objetivou-se avaliar a influência da maturação epididimária sobre os miRNA espermáticos bovinos, identificando quais tiveram sua quantidade aumentada ou diminuída após passar pelo canal do epidídimo. Foram utilizadas amostras de sêmen de cinco touros para a extração e isolamento dos miRNAs, utilizando o kit mirVana™ miRNAisolation (Invitrogen), para posterior construção de biblioteca, utilizando o kit RealSeq®-AC (Small RNA SomaGenics®) e para sequenciamento, utilizando a IlluminaNextSeq™ 500 V2 high-output 75 ciclos. Para a análise da quantidade de miRNAs foram utilizados na seleção e normalização dos dados os softwares DESeq2 e edgeR. Foi possível identificar 28 miRNAs que tiveram sua quantidade diminuída após passar pelo canal do epidídimo e 40 miRNAs que tiveram sua quantidade aumentada. Portanto, a partir desse trabalho, foi possível evidenciar que a maturação epididimária promove alteração no conteúdo de miRNAs dos espermatozoides bovinos, sendo de extrema importância para aprimorar a predição e o diagnóstico de problemas de fertilidade em touros, posteriormente, expandindo esses estudos em humanos.

Palavras-chave: microRNA, espermatozoide, epidídimo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. MicroRNAs.....	2
2.2. Espermatogênese e miRNAs espermáticos.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. Objetivo geral.....	5
3.2. Objetivos específicos.....	5
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4.1. Amostras de sêmen.....	6
4.2. Extração dos micro-RNAs espermáticos.....	7
4.3. Sequenciamento de RNAs (RNA-seq).....	7
4.4. Análise da diferença na quantidade nos micro-RNAs antes e após a passagem pelo epidídimo.....	8
4.5. Identificação dos miRNAs após análise da diferença da quantidade de miRNAs.....	9
5. RESULTADOS.....	9
6. DISCUSSÃO.....	11
7. CONCLUSÃO.....	14
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
9. ANEXOS.....	17

1. INTRODUÇÃO

A fertilidade masculina está relacionada com diversos fatores físicos, hormonais e genéticos, que estão diretamente ligados à produção de espermatozoides funcionais, e também à sua chegada ao local da fecundação. O dano de alguma dessas funções reprodutivas masculinas é responsável por grande parte dos problemas de fertilidade no ser humano (ALVES; CELEGHINI; BELLEANNÉE, 2020). Com isso, vê-se a necessidade de aprimorar novas ferramentas de diagnóstico para avaliar o potencial de fertilidade masculina. Nesse contexto, já existem diversos estudos, como Alves et. al (2021) e Zhao et. al (2021), que relacionam a fertilidade de bovinos com a detecção de micro-RNAs nos espermatozoides. Essa assimilação é possível já que bovinos são exemplos de animais utilizados como modelo de estudo nos mais diversos campos da pesquisa biológica, como já descrito em estudos de fisiologia por Claude Bernard (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Os micro-RNAs são uma família de pequenas moléculas de RNA não codificantes de proteínas que atuam no silenciamento pós-transcricional de genes, impedindo a tradução ao se parearem em seus mRNAs-alvo, levando-os à degradação ou inibição (ZHAO et al., 2021). Além disso, esses miRNAs coordenam diversos eventos biológicos, incluindo diferenciação, apoptose e proliferação (YANG et al., 2018), reprodução, resposta ao estresse, metabolismo e resposta imune (HUANG et al., 2011) e manutenção de células-tronco (GANGARAJU; LIN, 2009).

Durante a espermatogênese, as células germinativas masculinas expressam também outras classes de RNAs, como RNA nuclear pequeno (snRNA) e RNA interferente pequeno (siRNA), mas os miRNAs ganham destaque por possuírem papel importante em muitos processos regulatórios (YADAV; KOTAJA, 2014). Esses miRNAs são expressos no tecido testicular de formas distintas em cada célula da espermatogênese, tendo

importantes funções neste processo. A maioria desses miRNAs desaparecem durante a espermatogênese, contudo, uma pequena quantidade continua nos espermatozoides após a espermição (KOTAJA, 2014).

Após a espermição (liberação dos espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero) os espermatozoides passam pelo epidídimo, que é constituído de cabeça, corpo e cauda, respectivamente. Durante esse trajeto, os espermatozoides sofrem a maturação epididimária, que são alterações fisiológicas e bioquímicas essenciais para a fecundação. Diversas alterações ocorrem durante a maturação epididimária e aparentemente, as microvesículas liberadas pelo epitélio do epidídimo, os epididimossomos, são adsorvidos pelos espermatozoides, contribuindo com essas alterações ocorridas durante a maturação epididimária. No interior dos epididimossomos, já foram encontrados, dentre diversas substâncias, miRNAs (REILLY et al., 2016).

Independente da origem dos miRNAs espermáticos, Alves *et al.* (2017) sugere que essas moléculas seriam importantes na predição da fertilidades em touros, provavelmente por atuar no desenvolvimento embrionário. Corroborando com isso, Souza (2019) encontrou correlações significativas, positivas e negativas, entre alguns miRNAs espermáticos e o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*. Portanto, fica evidente a importância de estudos dos miRNAs espermáticos quanto sua origem e função, devido à sua correlação com a fertilidade, sendo sugerido a avaliação destas moléculas para a predição da fertilidade em touros.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MicroRNAs

Os micro-RNAs constituem uma família de pequenas moléculas de RNA não codificadoras de proteínas que atuam no silenciamento pós-transcricional de genes, ou seja,

eles impedem a tradução, por degradação ou inibição, pareando-se em seus mRNAs-alvo (ZHAO et al., 2021). Ademais, esses miRNAs também coordenam outros eventos biológicos, como diferenciação, apoptose e proliferação (YANG et al., 2018), reprodução, resposta ao estresse, metabolismo e resposta imune (HUANG et al., 2011) e manutenção de células-tronco (GANGARAJU; LIN, 2009).

A sua biogênese tem início no núcleo da célula, em que o gene do miRNA sofre transcrição pela ação da RNA polimerase II ou III. Com isso, há a formação de um miRNA primário que é metilado e processado pelo complexo enzimático Drosha/DGCR8, formando um pré-microRNA (pré-miRNA). Esse pré-miRNA é exportado para o citoplasma, através da proteína de canal chamada exportina e sofre a ação de duas proteínas, a Dicer (proteína de ligação de RNA responsiva a trans-ativação) e a TRBP (proteína de ligação de RNA), formando um miRNA-duplex. Esse miRNA, agora maduro, junta-se com a proteína argonauta (AGO2) e forma o complexo RISC. O complexo RISC (complexo silenciador induzido por RNA), se liga ao seu RNA mensageiro alvo e regula a tradução, por inibição ou degradação (VASHISHT; GAHLAY, 2020).

Esses miRNAs podem ter vários ou apenas um gene alvo na célula e foi através disso que se verificou a importância e a presença dos miRNAs, ou seja, quando a expressão de um ou mais genes está intensificada, mas a tradução da proteína codificada está diminuída, observado pela primeira vez em 1993 por Lee, Feinbaum e Ambros.

Já descrito anteriormente por Reilly *et. al* (2016), esses miRNAs foram encontrados dentro dos epididimossomos que se acredita serem os responsáveis pelas alterações no conteúdo de miRNAs no processo de maturação epididimária. Assim, o conhecimento de como a maturação epididimária interfere no conteúdo de miRNAs espermáticos, certamente será muito útil na compreensão da etiologia e no

desenvolvimento de possíveis tratamentos de problemas de fertilidade provocados pelo conteúdo de miRNA dos espermatozoides.

2.2 Espermatogênese e miRNA espermáticos

A espermatogênese consiste na produção de gametas masculinos, os espermatozoides, a partir de células germinativas, e, ocorre dentro dos túbulos seminíferos. Essa célula germinativa sofre diferenciação gerando as espermatogônias (A). Estas, também sofrem mitose, gerando outras espermatogônias (B), que entram em prófase I da meiose e passam a ser denominadas espermatócitos primários. Este, o final da primeira divisão meiótica gera os espermatócitos secundários e estes, após a segunda divisão meiótica, ou seja, após o final da meiose, geram as espermátides, que são células haploides. As espermátides sofrem intensas alterações morfológicas (espermiogênese), e assim, transformam-se em espermatozoides (AGUIAR; ARAÚJO; MOURA, 2006). Portanto, ocorrem três processos: proliferação mitótica da espermatogônia, meiose de espermatócitos e diferenciação das espermátides haploide em espermatozoides (KOTAJA, 2014).

Durantes a espermatogênese, as células germinativas masculinas expressam várias classes de RNAs, entre elas, os miRNAs (YADAV; KOTAJA, 2014), que ganham destaque por possuírem papel importante em muitos processos regulatórios, como descrito anteriormente. Esses miRNA são expressos no tecido testicular de forma distintas por cada célula da espermatogênese (KOTAJA, 2014), influenciando a espermatogênese e conseqüentemente, o sucesso reprodutivo.

Após a formação dos espermatozoides nos testículos, ocorre o processo de maturação espermática. A maturação ocorre no canal do epidídimo, uma importante

estrutura do trato reprodutivo. À medida que os espermatozoides amadurecem no lúmen do epidídimo, seu potencial de mobilidade aumenta e seu conteúdo de proteínas, lipídios e pequenos RNAs (sRNA) muda, enquanto a capacitação e a fertilização ocorrerão no trato reprodutivo feminino. Ambos os últimos processos são afetados pela maturação, porque a maturação prejudicada causa capacitação e fertilização prematuras. O epidídimo produz um ambiente adequado para a maturação dos espermatozoides via transporte de íons, secreção de vesículas (epididimossomos) e formação de matriz proteica.

O microambiente para a maturação dos espermatozoides varia em três grandes segmentos: cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Os epididimossomos transferem proteínas, lipídios e sRNAs do epitélio epididimal para os espermatozoides e as alterações genéticas dos genes do epidídimo podem levar à diminuição da motilidade dos espermatozoides, anormalidades morfológicas dos espermatozoides e subfertilidade. Fatores genéticos estão envolvidos em todas as categorias etiológicas da infertilidade masculina. No entanto, os estudos realizados sobre os genes envolvidos nas funções do epidídimo são limitados. O conteúdo de sRNA dos espermatozoides muda durante a migração do epidídimo, e esses sRNAs desempenham um papel no desenvolvimento do embrião e na herança epigenética (NIXON et al., 2015; OZKOCER; KONAC, 2021). Já foi descrito que os epididimossomos carregam consigo informações genéticas, como os miRNAs (HOOG; LUNAVAT, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da maturação epididimária sobre os miRNA espermáticos bovinos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Identificar e caracterizar quais miRNAs tem sua quantidade significativamente aumentada após passar pelo canal do epidídimo.

2. Identificar e caracterizar quais miRNAs tiveram sua quantidade significativamente diminuída após passar pelo canal do epidídimo.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de espermatozoides

Foram utilizados cinco testículos de touros nelores com dois a três anos coletados em frigoríficos em Uberlândia. Após a retirada dos testículos estes foram acondicionados individualmente em sacos plásticos identificados, os quais foram colocados em caixas de isopor com gelo reciclável e imediatamente levados ao Laboratório de Biologia da Reprodução do ICBIM/UFU. Chegando ao laboratório, os epidídimos de cada testículo foram dissecados, separando-se a cabeça e cauda.

As cabeças e caudas de cada testículo foram colocadas separadamente em placas de Petri (60x15) plástica com 4 mL de PBS. Posteriormente, as peças foram recortadas em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento e comprimidas delicadamente com a ponta dos dedos por 3 minutos. Mais 4 mL de PBS foram aplicados sobre os fragmentos para retirada do maior número possível de espermatozoides e um mínimo de células somáticas.

A suspensão de células obtida a partir dos epidídimos foi centrifugada e o pellet ressuspense em 3 mL de tampão de lise de células somáticas (SCLB), feito de 0,05 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,25% de Triton X - 100, e incubado em gelo por 10 min. A solução foi então centrifugada a 1400 g por 10 minutos e o pellet ressuspense em 3 mL de PBS e novamente centrifugado nas mesmas condições. Essa etapa foi repetida mais duas vezes para retirada dos micro-RNAs das células somáticas lisadas.

4.2. Extração dos micro-RNAs espermáticos

Para a extração e isolamento dos miRNAs foi utilizado o kit mirVana™ miRNAisolation (Invitrogen) (cat. num: AM1560) para a extração de RNAs. Imediatamente após o isolamento dos espermatozoides, o pellet obtido após a última lavagem com PBS foi ressuspenso em 300 µL de lysis/bindingsolution, com posterior processamento da amostra conforme instruções do fabricante do kit mirVana™. Após a última etapa de extração do RNA espermático (eluição com 100 uL de elutionsolution a 100°C), os RNAs foram colocados em tubos estabilizadores de RNA (RNA stable® / LD) (Biomatrixcatalog #90221-001) e deixados overnight em câmara de vácuo para secar.

Após a secagem completa de cada amostra nos tubos de RNAsstable, esses foram selados e armazenados em câmara de vácuo à temperatura ambiente a fim de se manter a baixa humidade, que poderia danificar as amostras, até serem enviados para o sequenciamento.

4.3. 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 foram purificadas 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* (fragmentos de leitura) 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 selecionadas; as demais *reads* foram contadas e descartadas dessa análise. Para quantificação das *reads* identificadas como RNAs não codificadores de proteínas, exceto piRNAs (RNAs que interagem com Piwi) e miRNAs, tais como tRNA (RNA transportador), rRNA (RNA ribossômico), snoRNA (pequenos RNAs nucleolares), snRNA (pequenos RNAs nucleares), 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.

4.4. Análise da diferença na quantidade nos micro-RNAs antes e após a passagem pelo epidídimo

Para a análise da quantidade de miRNAs foram utilizados na seleção e normalização dos dados os softwares DESeq2 e edgeR.

Pelo pacote edgeR do bioconductor foram lidas as tabelas contendo as contagens para cada miRNA referente a cada amostra geradas no passo anterior. Cada amostra foi atribuída a um grupo (amostras das cabeças e amostras das caudas dos epidídimos). Em seguida foi realizada a normalização das bibliotecas de contagem para cada amostra por funções do próprio edgeR ou DESeq2, estabelecida uma amostra como referência, estimados os coeficientes de dispersão, realizados os testes estatísticos para cada par de amostras comparadas e filtrados os miRNAs com baixa contagem normalizada pelo software HTSFilter. Foi então verificada a diferença na quantidade de miRNA entre os dois grupos e aqueles miRNAs com valor de “p” estatístico ajustado menor que “0.05” (FDR < 0.05 edgeR e padj-value < 0.05 DESeq2), bem como valores de logFoldChange

> 1 ou < -1 foram considerados diferencialmente expressos entre as amostras comparadas para cada condição.

4.5 Identificação dos miRNAs após análise da diferença da quantidade de miRNAs

A partir dos valores obtidos da análise da expressão diferencial, foi feita uma comparação entre os dados dos softwares DESeq2 e edgeR. Foram utilizados para análise apenas os miRNAs comuns em ambos softwares.

RESULTADOS

No software edgeR, 76 miRNAs tiveram uma diferença significativa na quantidade, observados a partir dos valores de FDR (*false discovery rate*) menores que 0,05. Enquanto que no DESeq, 83 miRNAs apresentaram mudanças estatisticamente significativas, avaliados a partir dos valores de padj-value (*adjusted p-value – “Bonferroni adjustment”*) menores que 0,05 também. A partir disso, a análise feita identificou 68 miRNAs que eram comuns em ambos os softwares, sendo que 28 tiveram sua quantidade diminuída, enquanto outros 40 tiveram sua quantidade aumentada após os espermatozoides passarem pelo epidídimo. Os miRNAs identificados estão dispostos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: micro-RNAs que tiveram sua quantidade aumentada após passar pelo canal do epidídimo e seus respectivos valores de FDR e padj.

miRNAs	FDR	padj
bta-miR-2284x	1,24E-12	2,70E-24
bta-miR-6526	1,59E-11	7,58E-20
bta-miR-2284m	3,92E-11	2,17E-17
bta-miR-2284y	1,18E-09	2,48E-16
bta-miR-100	1,18E-09	1,09E-16
bta-miR-2285av	1,18E-09	2,48E-16
bta-miR-2284k	1,82E-09	4,60E-16
bta-miR-335	2,57E-07	3,59E-11
bta-miR-132	5,19E-07	7,95E-11

bta-miR-2285bf	2,57E-06	4,75E-16
bta-miR-145	4,69E-06	5,96E-08
bta-miR-143	4,69E-06	1,60E-10
bta-miR-196a	8,63E-06	4,37E-11
bta-miR-196b	8,63E-06	1,16E-08
bta-miR-16b	1,31E-05	5,00E-08
bta-miR-16a	6,28E-05	2,10E-08
bta-miR-130b	1,24E-04	1,38E-07
bta-miR-2284aa	2,45E-04	3,99E-08
bta-miR-2284z	2,52E-04	3,98E-08
bta-miR-191	2,91E-04	2,29E-08
bta-miR-9-3p	3,97E-04	1,38E-07
bta-miR-424-5p	4,35E-04	9,85E-07
bta-miR-3432a	7,67E-04	1,41E-04
bta-miR-424-3p	1,01E-03	3,16E-05
bta-miR-32	1,97E-03	3,14E-05
bta-miR-3432b	2,41E-03	2,06E-04
bta-miR-449a	2,77E-03	7,35E-04
bta-miR-190b	5,74E-03	1,77E-04
bta-miR-6529a	8,70E-03	3,30E-03
bta-miR-34b	9,90E-03	2,16E-04
bta-miR-146a	1,99E-02	5,13E-04
bta-miR-380-3p	2,00E-02	8,68E-04
bta-miR-28	2,80E-02	1,82E-03
bta-miR-130a	2,97E-02	1,52E-03
bta-miR-2285b	3,12E-02	6,01E-03
bta-miR-27-a-3p	3,44E-02	1,12E-03
bta-miR-95	3,54E-02	9,59E-03
bta-miR-126-5p	4,00E-02	4,64E-03
bta-miR-140	4,10E-02	4,65E-04
bta-miR-27b	4,15E-02	4,24E-03

Tabela 2: micro-RNAs que tiveram sua quantidade diminuída após passar pelo canal do epidídimo e seus respectivos valores de FDR e padj.

miRNAs	FDR	padj
bta-miR-31	2,57E-13	3,41E-30
bta-miR-2904	1,00E-10	2,17E-17
bta-miR-429	1,51E-08	2,76E-11
bta-miR-12034	2,00E-06	3,09E-07
bta-miR-200c	2,00E-06	2,70E-16
bta-miR-26b	4,33E-05	1,32E-06
bta-miR-507b	6,74E-05	8,07E-09
bta-miR-200a	7,27E-05	2,64E-05
bta-miR-2887	1,11E-04	1,35E-05
bta-miR-1307	1,52E-04	2,74E-08
bta-miR-200b	2,46E-04	1,18E-04

bta-miR-11980	3,32E-04	6,83E-07
bta-miR-181a	7,67E-04	1,31E-05
bta-miR-29b	1,88E-03	2,94E-05
bta-miR-11975 e 11976	3,77E-03	1,02E-03
bta-miR-135a	3,34E-03	5,54E-04
bta-miR-96	6,25E-03	3,17E-04
bta-miR-1949	6,83E-03	3,89E-03
bta-miR-141	7,49E-03	5,80E-03
bta-miR-30-a-5p	8,70E-03	3,30E-03
bta-miR-224	1,01E-02	9,17E-04
bta-let-7b	1,14E-02	5,25E-04
bta-let-7f	1,16E-02	3,16E-03
bta-miR-122	2,27E-02	6,58E-03
bta-miR-181b	2,64E-02	7,79E-03
bta-miR-182	2,93E-02	1,42E-03
bta-let-7-a-5p	3,54E-02	6,01E-03

DISCUSSÃO

Os miRNAs possuem um papel muito importante na regulação de genes pós-transcricional, e, com isso, eles têm sido associados cada vez mais com a regulação de processos biológicos, como por exemplo, a maturação epididimária, que foi o foco desse estudo. Utilizando os *softwares* edgeR e DESeq, foi possível identificar 28 miRNAs que tiveram sua quantidade diminuída após passar pelo canal do epidídimo e 40 miRNAs que tiveram sua quantidade aumentada. A quantificação feita nesses softwares é proporcional, ou seja, há possibilidade de o aumento e diminuição das expressões não ser nominal, sendo já sugerido aqui a realização de mais estudos. Provavelmente, os que tiveram a quantidade diminuída foi devido à instabilidade da molécula do miRNA e à sua degradação natural durante a maturação epididimária. E a quantidade aumentada pode ser por recebimento de miRNA por meio dos epididimossomos, como já descrito por Reilly et al. (2016) e Ozkocer; Konac, (2021). Além disso, os miRNAs exacerbam genes de expressão; se um miRNA X tiver a função de bloquear a expressão de um miRNA Y, mas X bloqueado/diminuído, Y terá sua expressão aumentada. Assim, a presença de um miRNA não necessariamente significa a menor expressão de uma proteína.

Estudos de bioinformática são necessários para identificar possíveis genes alvos dos miRNAs identificados neste estudo, que estejam envolvidos espermatogênese, na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial. Mesmo não tendo sido realizados tais estudos, é possível discutir algumas alterações na quantidade de miRNAs encontradas no presente trabalho, baseando-se em trabalhos anteriores onde foram descritas atividades celulares com o envolvimento destes miRNAs, como feito a seguir.

No presente trabalho, o miRNA bta-miR-31 teve sua quantidade diminuída nos espermatozoides depois de passarem pelo epidídimo (tabela 2). A expressão diminuída de bta-miR-31 já foi descrita anteriormente em testículos de homens inférteis, o que sugere que seu papel esteja relacionado com o bom desenvolvimento inicial de espermatozoides (MUÑOZ et al., 2015). Assim, este miRNA seria expresso durante a espermatogênese, ocorrendo sua degradação durante a maturação epididimária, o que foi demonstrado pela intensa diminuição de sua quantidade nos espermatozoides após a passagem pelo epidídimo.

Os miRNAs bta-miR-122, bta-miR-200a e bta-miR-182 apresentaram expressão elevada em bovinos infectados com mastite induzida por *E. coli*, portanto, tem suas funções relacionadas com a resposta inflamatória (LUORENG et al., 2018). Kasimanickam e Kastelic (2016), também associaram a elevada expressão de bta-miR-29b, bta-miR-26b e bta-miR-200b com a resposta inflamatória. Assim como bta-miR-200c foi relatado com a produção de citocinas envolvidas na resposta imune (ZHAO et al., 2019). No presente trabalho, esses sete miRNAs tiveram sua quantidade diminuída nos espermatozoides após a maturação epididimária. Nesse caso, especula-se que estes miRNAs seriam resíduos de possíveis processos imunológicos testiculares e que devem ser eliminados dos espermatozoides, o que ocorreria durante a maturação epididimária, conforme demonstrado pelos resultados do presente trabalho (tabela 2). Apesar de menos

provável, não se pode descartar possível função ou funções destes miRNAs diretamente na espermatogênese e que deixariam de ser úteis após a espermiacão.

O miRNA bta-miR-224 parece ter uma função relacionada à oxidação de ácidos graxos, pois existem estudos que relacionam sua expressão com doenças como obesidade e diabetes (SHEN et al., 2016). Assim como bta-miR-181a também regula o metabolismo de lipídios via isocitrato desidrogenase (CHU et al., 2015). Esses dois miRNAs tiveram sua quantidade diminuída durante a maturação epididimária (tabela 2) e, portanto, provavelmente seriam úteis apenas até a espermiacão, mas não na fecundação e desenvolvimento embrionário inicial.

Deb e Sengar (2021) relacionaram a expressão de bta-let-7b e bta-mir-181b, em diferentes raças de gado durante o verão (onde há um grande estresse pelo calor), com o estresse oxidativo. A diminuição desses miRNAs após a maturação epididimária (tabela 2) pode ser porque tais miRNAs são importantes para uma correta espermatogênese em condições de estresse calórico, mas uma vez ocorrida a espermiacão, eles deixam de serem necessários e são degradados no epidídimo.

O miRNA 11795 e 11796 já foram descritos como tendo correlação negativa com o desenvolvimento inicial *in vitro* de embriões bovinos (SOUZA, 2019). Ou seja, sua presença dificultaria o desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, a necessidade da eliminação destes miRNAs nos espermatozoides durante a passagem pelo epidídimo é totalmente justificável e necessária e foi observada neste trabalho (tabela 2).

Souza (2019) verificou uma correlação negativa dos miRNAs bta-miR-2285bf e bta-miR 335 com o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*. Portanto era de se esperar um aumento na quantidade desses miRNAs durante a maturação epididimária, mas, estranhamente, no presente trabalho, verificou-se uma diminuição. Faz-se necessários novos trabalhos para esclarecer esta controvérsia.

Todos os miRNAs anteriormente discutidos, tiveram sua quantidade diminuída durante a maturação epididimária. Não foram encontradas referências que tratem dos miRNAs que tiveram sua quantidade aumentada, o que reforça a necessidade de trabalhos de bioinformática sobre os alvos e possíveis funções desses miRNAs. O aumento na quantidade desses miRNAs possivelmente se deu por meio dos epididimossomos e provavelmente estejam envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial ou mesmo na capacitação final dos espermatozoides que ocorrerá durante a passagem no trato genital feminino.

CONCLUSÃO

A maturação epididimária promove alteração no conteúdo de miRNAs dos espermatozoides bovinos, aumentando a quantidade de alguns e diminuindo a quantidade de outros miRNAs.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. V.; ARAÚJO, A. A.; MOURA, A. DE A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de**

Zootecnia, v. 35, n. 4, p. 1629–1638, 2006. DOI:[10.1590/S1516-35982006000600008](https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000600008)

ALVES, M. et al. Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls.

Theriogenology, [s.l.], v. 161, p. 26–40, 1 fev. 2021.

DOI: [10.1016/j.theriogenology.2020.11.015](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.015)

ALVES, M. et al. MicroRNAs: uma nova abordagem para a predição da fertilidade em touros, Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.46-53, 2017. Disponível em: <[p046-053 \(RB665\).pdf \(cbra.org.br\)](https://p046-053(RB665).pdf(cbra.org.br))>.

ALVES, M. B. R.; CELEGHINI, E. C. C.; BELLEANNÉE, C.. From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s.l.], v.8, p.791, 2020.

DOI: [10.3389/fcell.2020.00791](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00791)

CHU, B. et al. MiR-181a regulates lipid metabolism via IDH1. **Scientific Reports 2015 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 5 mar. 2015. DOI: [10.1038/srep08801](https://doi.org/10.1038/srep08801)

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59–65, jan. 2004. DOI: [10.1590/S0102-86502004000100010](https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000100010)

GANGARAJU, V. K.; LIN, H. MicroRNAs: Key regulators of stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v.10, n.2, p.116-125, 2009. DOI:

[10.1038/nrm2621](https://doi.org/10.1038/nrm2621). Disponível em: <[MicroRNAs: key regulators of stem cells \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2711111/)>.

HUANG, Y. et al. Biological functions of microRNAs: A review. **Journal of Physiology and Biochemistry (Springer)**, [s.l.], v.67, n.1, p.129-139, 28 mar. 2011.

DOI: [10.1007/s13105-010-0050-6](https://doi.org/10.1007/s13105-010-0050-6).

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

KASIMANICKAM, V.; KASTELIC, J. Circulating cell-free mature microRNAs and their target gene prediction in bovine metritis. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 11 jul. 2016. DOI: [10.1038/srep29509](https://doi.org/10.1038/srep29509)

KOTAJA, Noora. MicroRNAs and spermatogenesis. **Fertility and Sterility (Elsevier Inc.)**, [s.l.], v.101, n.6, p. 1552-1562, 1 jun. 2014.

DOI: [10.1016/j.fertnstert.2014.04.025](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.025).

LUNAVAT, T. R.; CHENG, L.; KIM, D., BHADURY, J.; JANG, S. C.; LASSER, C.; SHARPLES, R. A.; LÓPEZ, M. D.; NILSSON J.; GHO, Y. S.; HILL, A. F.;

LOTVALL, J. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – Evidence of unique microRNA cargos. **RNA biology**,. 12, n. 8, p 810-823, 1 jan. 2015. DOI: [10.1080/15476286.2015.1056975](https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1056975)

LUORENG, Z.-M. et al. Expression profiling of peripheral blood miRNA using RNAseq technology in dairy cows with Escherichia coli-induced mastitis. **Scientific Reports 2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 23 ago. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30518-2>

MUÑOZ, X. et al. Altered miRNA Signature of Developing Germ-cells in Infertile Patients Relates to the Severity of Spermatogenic Failure and Persists in Spermatozoa. **Scientific Reports** 2015 5:1, v. 5, n. 1, p. 1–12, 9 dez. 2015. doi: [10.1038/srep17991](https://doi.org/10.1038/srep17991)

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

OZKOCER, E. R.; KONAC, E. The current perspective on genetic and epigenetic factors in sperm maturation in the epididymis. **Andrologia**, v. 53, n. 3, 1 abr. 2021. DOI: [10.1111/and.13989](https://doi.org/10.1111/and.13989)

REILLY, Jackson N. et al. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. **Scientific Reports**, [s.l.], v.6, n.1, p.1–15, 23 ago. 2016. DOI: [10.1038/srep31794](https://doi.org/10.1038/srep31794).

SHEN, B. et al. Deep Sequencing and Screening of Differentially Expressed MicroRNAs Related to Milk Fat Metabolism in Bovine Primary Mammary Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences** 2016, Vol. 17, Page 200, v. 17, n. 2, p. 200, 17 fev. 2016. doi: [10.3390/ijms17020200](https://doi.org/10.3390/ijms17020200)

SOUZA, Gabriel L. I. **Micro-RNAs espermáticos correlacionados com a fertilização e o desenvolvimento inicial de embriões bovinos (*Bos taurus*) in vitro**. 2019. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

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

YADAV, Ram P.; KOTAJA, Noora. Small RNAs in spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s.l.], v.382, n.1, p.498–508, 25 jan. 2014. DOI:[10.1016/j.mce.2013.04.015](https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.015).

YANG, Xuehui et al. Circulating miRNA Expression Profiling and Target Prediction in Patients Receiving Dexmedetomidine. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 2, p. 552–568, 1 out. 2018. DOI: [10.1159/000494168](https://doi.org/10.1159/000494168).

ZHAO, G. et al. MiRNA profiling of plasma-derived exosomes from dairy cows during gestation. **Theriogenology**, v. 130, p. 89–98, 1 maio 2019. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2019.03.001](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.001)

ZHAO, Wangsheng et al. Comparative rna-seq analysis of region-specific miRNA expression in the epididymis of cattleyak. **Reproduction in Domestic Animals**, [s.l.], v.56, n.4, p555-576, 14 fev. 2021. DOI: [10.1111/rda.13893](https://doi.org/10.1111/rda.13893).

ANEXO I

Tabela com todos os micro-RNAs espermáticos encontrados nas amostras dos touros.

miRNAs

bta-let-7-a-3p_MIMAT0004330	bta-miR-2285cm_MIMAT0046682
bta-let-7-a-5p_MIMAT0003844	bta-miR-2285co_MIMAT0046686
bta-let-7b_MIMAT0004331	bta-miR-2285cp_MIMAT0046687
bta-let-7c_MIMAT0004332	bta-miR-2285cu_MIMAT0046698
bta-let-7d_MIMAT0003810	bta-miR-2285e_MIMAT0024580
bta-let-7e_MIMAT0004333	bta-miR-2285f_MIMAT0024581
bta-let-7f_MIMAT0003519	bta-miR-2285i_MIMAT0024584
bta-let-7g_MIMAT0003838	bta-miR-2285j_MIMAT0024585
bta-let-7i_MIMAT0003851	bta-miR-2285k_MIMAT0024586
bta-miR-10020_MIMAT0040419	bta-miR-2285l_MIMAT0024587
bta-miR-100_MIMAT0009215	bta-miR-2285m_MIMAT0025533
bta-miR-10167-3p_MIMAT0040914	bta-miR-2285n_MIMAT0025531
bta-miR-10172-5p_MIMAT0040920	bta-miR-2285q_MIMAT0025574
bta-miR-10174-3p_MIMAT0040928	bta-miR-2285u_MIMAT0031094
bta-miR-10183-5p_MIMAT0040942	bta-miR-2285v_MIMAT0025579
bta-miR-10185-5p_MIMAT0040944	bta-miR-2299-3p_MIMAT0011808
bta-miR-101_MIMAT0003520	bta-miR-2299-5p_MIMAT0011807
bta-miR-103_MIMAT0003521	bta-miR-2305_MIMAT0011817
bta-miR-106a_MIMAT0003784	bta-miR-2320-3p_MIMAT0011845
bta-miR-106b_MIMAT0009218	bta-miR-2336_MIMAT0011869
bta-miR-107_MIMAT0003785	bta-miR-2342_MIMAT0011877

bta-miR-10a_MIMAT0003786	bta-miR-2346_MIMAT0011881
bta-miR-10b_MIMAT0003839	bta-miR-2363_MIMAT0011901
bta-miR-11971_MIMAT0046336	bta-miR-2367-3p_MIMAT0011910
bta-miR-11972_MIMAT0046341	bta-miR-2367-5p_MIMAT0011909
bta-miR-11975_MIMAT0046354	bta-miR-2397-3p_MIMAT0011952
bta-miR-11976_MIMAT0046357	bta-miR-2399-3p_MIMAT0011955
bta-miR-11980_MIMAT0046368	bta-miR-23a_MIMAT0003827
bta-miR-11986b_MIMAT0046621	bta-miR-23-b-3p_MIMAT0003852
bta-miR-11987_MIMAT0046387	bta-miR-2419-5p_MIMAT0011985
bta-miR-11988_MIMAT0046393	bta-miR-2435_MIMAT0012007
bta-miR-11995_MIMAT0046648	bta-miR-24-3p_MIMAT0003840
bta-miR-12023_MIMAT0046716	bta-miR-2453_MIMAT0012034
bta-miR-12030_MIMAT0046723	bta-miR-2463_MIMAT0012050
bta-miR-12034_MIMAT0046727	bta-miR-2468_MIMAT0012058
bta-miR-12056_MIMAT0046763	bta-miR-2478_MIMAT0012070
bta-miR-122_MIMAT0003849	bta-miR-2483-3p_MIMAT0012076
bta-miR-1246_MIMAT0024567	bta-miR-2483-5p_MIMAT0012075
bta-miR-1249_MIMAT0009976	bta-miR-2484_MIMAT0012077
bta-miR-124a_MIMAT0003811_bta- miR-124b_MIMAT0013774	bta-miR-24_MIMAT0009250
bta-miR-125a_MIMAT0003538	bta-miR-25_MIMAT0003853
bta-miR-125b_MIMAT0003539	bta-miR-26a_MIMAT0003516
bta-miR-1260b_MIMAT0024568	bta-miR-26b_MIMAT0003531
bta-miR-126-3p_MIMAT0003540	bta-miR-27-a-3p_MIMAT0003532

bta-miR-126-5p_MIMAT0004328	bta-miR-27b_MIMAT0003546
bta-miR-1271_MIMAT0009975	bta-miR-2881_MIMAT0013839
bta-miR-1277_MIMAT0024569	bta-miR-2885_MIMAT0013843
bta-miR-127_MIMAT0003787	bta-miR-2887_MIMAT0013845
bta-miR-128_MIMAT0003541	bta-miR-28_MIMAT0009272
bta-miR-129-3p_MIMAT0009222	bta-miR-2904_MIMAT0013862
bta-miR-1306_MIMAT0009974	bta-miR-296-3p_MIMAT0009273
bta-miR-1307_MIMAT0009969	bta-miR-296-5p_MIMAT0026918
bta-miR-130a_MIMAT0009223	bta-miR-29a_MIMAT0003518
bta-miR-130b_MIMAT0009224	bta-miR-29b_MIMAT0003828
bta-miR-132_MIMAT0003812	bta-miR-29c_MIMAT0003829
bta-miR-133a_MIMAT0009225	bta-miR-29-d-3p_MIMAT0009275
bta-miR-135a_MIMAT0009228	bta-miR-29-d-5p_MIMAT0026919
bta-miR-135b_MIMAT0009229	bta-miR-29e_MIMAT0009953
bta-miR-136_MIMAT0009230	bta-miR-301a_MIMAT0009276
bta-miR-137_MIMAT0009231	bta-miR-301b_MIMAT0009277
bta-miR-1388-5p_MIMAT0013590	bta-miR-302b_MIMAT0009280
bta-miR-138_MIMAT0003813	bta-miR-302d_MIMAT0009279
bta-miR-139_MIMAT0003788	bta-miR-30-a-5p_MIMAT0003841
bta-miR-140_MIMAT0003789	bta-miR-30-b-3p_MIMAT0012534
bta-miR-141_MIMAT0009232	bta-miR-30-b-5p_MIMAT0003547
bta-miR-142-3p_MIMAT0003791	bta-miR-30c_MIMAT0003850
bta-miR-142-5p_MIMAT0003790	bta-miR-30d_MIMAT0003533
bta-miR-143_MIMAT0009233	bta-miR-30-e-5p_MIMAT0003799

bta-miR-145_MIMAT0003542	bta-miR-30f_MIMAT0009282
bta-miR-146a_MIMAT0009236	bta-miR-3141_MIMAT0024573
bta-miR-146b_MIMAT0009235	bta-miR-31_MIMAT0003548
bta-miR-147_MIMAT0009237	bta-miR-320a_MIMAT0003534
bta-miR-148a_MIMAT0003522	bta-miR-323_MIMAT0009284
bta-miR-148b_MIMAT0003814	bta-miR-324_MIMAT0009285
bta-miR-150_MIMAT0003845	bta-miR-32_MIMAT0009283
bta-miR-151-3p_MIMAT0003524	bta-miR-331-3p_MIMAT0004339
bta-miR-151-5p_MIMAT0003523	bta-miR-331-5p_MIMAT0026716
bta-miR-152_MIMAT0009238	bta-miR-335_MIMAT0009291
bta-miR-153_MIMAT0009239	bta-miR-338_MIMAT0009292
bta-miR-154a_MIMAT0009240	bta-miR-339a_MIMAT0009293
bta-miR-154c_MIMAT0025542	bta-miR-339b_MIMAT0012038
bta-miR-155_MIMAT0009241	bta-miR-33a_MIMAT0009294
bta-miR-1584-5p_MIMAT0011969	bta-miR-340_MIMAT0009296
bta-miR-15a_MIMAT0004334	bta-miR-342_MIMAT0003846
bta-miR-15b_MIMAT0003792	bta-miR-3431_MIMAT0017394
bta-miR-16a_MIMAT0009242	bta-miR-3432a_MIMAT0017396
bta-miR-16b_MIMAT0003525	bta-miR-3432b_MIMAT0036976
bta-miR-17-3p_MIMAT0003816	bta-miR-345-5p_MIMAT0003800
bta-miR-17-5p_MIMAT0003815	bta-miR-34a_MIMAT0004340
bta-miR-1777a_MIMAT0012032	bta-miR-34b_MIMAT0003549
bta-miR-1777b_MIMAT0012046	bta-miR-34c_MIMAT0003854
bta-miR-181a_MIMAT0003543	bta-miR-361_MIMAT0003830

bta-miR-181b_MIMAT0003793	bta-miR-362-3p_MIMAT0012548
bta-miR-181c_MIMAT0003817	bta-miR-362-5p_MIMAT0009298
bta-miR-181d_MIMAT0009243	bta-miR-363_MIMAT0003855
bta-miR-182_MIMAT0009244	bta-miR-3660_MIMAT0025555
bta-miR-1839_MIMAT0009968	bta-miR-369-3p_MIMAT0003802
bta-miR-183_MIMAT0009245	bta-miR-371_MIMAT0009301
bta-miR-184_MIMAT0009246	bta-miR-374a_MIMAT0004342
bta-miR-185_MIMAT0009247	bta-miR-374b_MIMAT0009302
bta-miR-186_MIMAT0003818	bta-miR-375_MIMAT0009303
bta-miR-18a_MIMAT0003526	bta-miR-376b_MIMAT0009945
bta-miR-18b_MIMAT0003517	bta-miR-376c_MIMAT0009947
bta-miR-190a_MIMAT0009251	bta-miR-376d_MIMAT0010199
bta-miR-190b_MIMAT0009252	bta-miR-376e_MIMAT0025543
bta-miR-191_MIMAT0003819	bta-miR-377_MIMAT0009304
bta-miR-192_MIMAT0003820	bta-miR-378b_MIMAT0025535
bta-miR-193-a-3p_MIMAT0003795	bta-miR-378c_MIMAT0025551
bta-miR-193b_MIMAT0009253	bta-miR-378_MIMAT0009305
bta-miR-194_MIMAT0009254	bta-miR-379_MIMAT0009306
bta-miR-195_MIMAT0004335	bta-miR-380-3p_MIMAT0003804
bta-miR-196a_MIMAT0009255	bta-miR-382_MIMAT0009308
bta-miR-196b_MIMAT0009256	bta-miR-409a_MIMAT0009310
bta-miR-197_MIMAT0009257	bta-miR-411a_MIMAT0009312
bta-miR-199-a-3p_MIMAT0003746	bta-miR-421_MIMAT0009314
bta-miR-199c_MIMAT0011871	bta-miR-423-3p_MIMAT0003831

bta-miR-19a_MIMAT0004336	bta-miR-423-5p_MIMAT0012537
bta-miR-19b_MIMAT0004337	bta-miR-424-3p_MIMAT0015304
bta-miR-1_MIMAT0009214	bta-miR-424-5p_MIMAT0013593
bta-miR-200a_MIMAT0003822	bta-miR-425-3p_MIMAT0003833
bta-miR-200b_MIMAT0003842	bta-miR-425-5p_MIMAT0003832
bta-miR-200c_MIMAT0003823	bta-miR-429_MIMAT0009315
bta-miR-202_MIMAT0009259	bta-miR-431_MIMAT0009316
bta-miR-204_MIMAT0004338	bta-miR-449a_MIMAT0009320
bta-miR-205_MIMAT0003545	bta-miR-449b_MIMAT0009321
bta-miR-20a_MIMAT0003527	bta-miR-449c_MIMAT0009322
bta-miR-20b_MIMAT0003796	bta-miR-450a_MIMAT0003834
bta-miR-210_MIMAT0003824	bta-miR-451_MIMAT0009323
bta-miR-211_MIMAT0009263	bta-miR-452_MIMAT0009324
bta-miR-212_MIMAT0009264	bta-miR-454_MIMAT0009326
bta-miR-215_MIMAT0003797	bta-miR-455-5p_MIMAT0003835
bta-miR-21-5p_MIMAT0003528	bta-miR-483_MIMAT0009327
bta-miR-216b_MIMAT0009266	bta-miR-484_MIMAT0003535
bta-miR-217_MIMAT0009267	bta-miR-487a_MIMAT0003805
bta-miR-219-3p_MIMAT0012547	bta-miR-487b_MIMAT0003847
bta-miR-221_MIMAT0003529	bta-miR-497_MIMAT0004343
bta-miR-222_MIMAT0003530	bta-miR-499_MIMAT0003536
bta-miR-223_MIMAT0009270	bta-miR-502a_MIMAT0009338
bta-miR-22-3p_MIMAT0012536	bta-miR-502b_MIMAT0009339
bta-miR-224_MIMAT0009271	bta-miR-532_MIMAT0003848

bta-miR-22-5p_MIMAT0003826	bta-miR-539_MIMAT0009342
bta-miR-2284aa_MIMAT0025560	bta-miR-543_MIMAT0009344
bta-miR-2284a_MIMAT0011906	bta-miR-545-3p_MIMAT0003807
bta-miR-2284b_MIMAT0011983	bta-miR-545-5p_MIMAT0003806
bta-miR-2284c_MIMAT0011926	bta-miR-574_MIMAT0024577
bta-miR-2284d_MIMAT0011836	bta-miR-6119-5p_MIMAT0024588
bta-miR-2284e_MIMAT0012080	bta-miR-6120-3p_MIMAT0024591
bta-miR-2284-h-5p_MIMAT0012019	bta-miR-6123_MIMAT0024596
bta-miR-2284k_MIMAT0011907	bta-miR-6522_MIMAT0025540
bta-miR-2284l_MIMAT0011824	bta-miR-6526_MIMAT0025556
bta-miR-2284m_MIMAT0011976	bta-miR-6528_MIMAT0025562
bta-miR-2284o_MIMAT0012068	bta-miR-6529a_MIMAT0025565
bta-miR-2284p_MIMAT0011885	bta-miR-652_MIMAT0024578
bta-miR-2284q_MIMAT0011957	bta-miR-6534_MIMAT0025570
bta-miR-2284v_MIMAT0011937	bta-miR-6536_MIMAT0025572
bta-miR-2284x_MIMAT0017395	bta-miR-660_MIMAT0004344
bta-miR-2284y_MIMAT0024579	bta-miR-708_MIMAT0009367
bta-miR-2284z_MIMAT0025559	bta-miR-760-3p_MIMAT0022951
bta-miR-2285aa_MIMAT0030435	bta-miR-767_MIMAT0009375
bta-miR-2285ac_MIMAT0030440	bta-miR-769_MIMAT0009376
bta-miR-2285ad_MIMAT0030446	bta-miR-7857-5p_MIMAT0030432
bta-miR-2285aj-5p_MIMAT0040947	bta-miR-7859_MIMAT0030434
bta-miR-2285al-5p_MIMAT0040949	bta-miR-7861_MIMAT0030441
bta-miR-2285ap_MIMAT0046362	bta-miR-7865_MIMAT0030450

bta-miR-2285at_MIMAT0046342	bta-miR-7_MIMAT0003843
bta-miR-2285au_MIMAT0046346	bta-miR-873_MIMAT0009377
bta-miR-2285av_MIMAT0046347	bta-miR-876_MIMAT0009380
bta-miR-2285aw_MIMAT0046348	bta-miR-885_MIMAT0009382
bta-miR-2285ba_MIMAT0046373	bta-miR-92a_MIMAT0009383
bta-miR-2285bf_MIMAT0046382	bta-miR-92b_MIMAT0009384
bta-miR-2285bg_MIMAT0046386	bta-miR-935_MIMAT0009385
bta-miR-2285bl_MIMAT0046623	bta-miR-93_MIMAT0003837
bta-miR-2285b_MIMAT0011833	bta-miR-9-3p_MIMAT0012549
bta-miR-2285bo_MIMAT0046627	bta-miR-95_MIMAT0009387
bta-miR-2285bp_MIMAT0046633	bta-miR-96_MIMAT0009388
bta-miR-2285bq_MIMAT0046635	bta-miR-98_MIMAT0003809
bta-miR-2285bw_MIMAT0046643	bta-miR-99-a-3p_MIMAT0012533
bta-miR-2285bz_MIMAT0046646	bta-miR-99-a-5p_MIMAT0003537
bta-miR-2285cf_MIMAT0046663	bta-miR-99b_MIMAT0004345
bta-miR-2285cl_MIMAT0046681	bta-miR-507b_MIMAT0046744
	bta-miR-1949_MIMAT0046755