

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

**PAULO COSTA ALVES JUNIOR**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO PROVOCA ALTERAÇÕES DOS  
MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS?**

**ORIENTADOR:  
PROF. DR. MARCELO EMÍLIO BELETTI**

**UBERLÂNDIA - MG  
2023**

**PAULO COSTA ALVES JUNIOR**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO PROVOCA ALTERAÇÕES DOS  
MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS?**

Trabalho de Conclusão de Curso II, encaminhado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

**UBERLÂNDIA - MG**

**2023**

# **CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO PROVOCA ALTERAÇÕES DOS MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS?**

Trabalho de Conclusão de Curso II, encaminhado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Uberlândia, 25 de Janeiro de 2023.

---

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

---

Me. Luisa Miglio

---

Me. Marcos Paulo Oliveira Almeida

*“If you are able to look yourself in  
the mirror every day with the  
decisions that you make,  
that’s where power starts.”*

- Selena Gomez

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento que tornou a execução deste projeto possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti por ser um orientador e pesquisador incrivelmente compreensível e solícito, por ter acreditado em mim e alimentado o meu amor pela pesquisa e pela biologia da reprodução e desenvolvimento. Foi incrível ter um mentor como ele. Agradeço à banca avaliadora, Me. Luisa Miglio e Me. Marcos Paulo pela prestatividade em avaliar e auxiliar nesse trabalho em pleno início do ano com todo o carinho e atenção.

Agradeço imensamente à toda equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução UFU que esteve presente desde o meu início na pesquisa. Cada um de vocês foram essenciais em todos os processos envolvidos no desenvolvimento deste projeto e de vários outros do laboratório. Desde a higienização de vidrarias até a coleta dos materiais biológicos, o trabalho em grupo com vocês foi de suma importância. Agradeço, em especial, a Natália Sossai, novamente Luisa Miglio, Lucas Melo, Muller e Gabriel por todos os ensinamentos e parcerias nessa grande caminhada pelo laboratório.

Agradeço a toda minha família, em especial os meus pais, Paulo e Marluce, e o meu irmão Franklyn, por terem me proporcionado a calma, o apoio, o amor e a paciência. Vocês são luz na minha vida.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram comigo desde o início dessa pesquisa, e aqui gostaria de citar, especialmente, os que sempre escutaram e acalmaram o meu coração em momentos de desespero e ansiedade: Luiza Sanchez, Maria Luísa, Deborah Policarpo, Lara Coelho, Lara Franco, Ana Lúcia, Anny Ambrósio, Monize de Paula, Christian Reis, Márcio Damásio, Vinícius Ariel, Michele Freitas, Amanda Nogueira, Christian Benedicto, Gabriel Jasinevícius, Leandro Santos, Victor Costa e Luiz Paulo. O amor e o carinho de todos vocês nunca serão esquecidos.

E, por fim, gostaria de agradecer a mim por ter sido forte durante todo esse trajeto, apesar de quase desistir muitas vezes. Sinto-me orgulhoso de ter vencido cada luta e ter chegado aqui.

Por tudo isso e por muito mais, o meu mais profundo e sentimental “obrigado”.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	10
2.1. ESPERMATOZOIDE.....	10
2.2. ESPERMATOGÊNESE.....	11
2.3. CRIOPRESERVAÇÃO E MICRO-RNA.....	11
3. OBJETIVO .....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4.1. AMOSTRAS DE SÊMEN .....	12
4.2. SELEÇÃO ESPERMÁTICA E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	13
4.3. ISOLAMENTO DE MIRNA .....	14
4.4. SEQUENCIAMENTO DE RNAS (RNA-SEQ) .....	14
4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-RNAS NAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS.....	15
4.6. ANÁLISE DE POSSÍVEIS DIFERENÇAS NA QUANTIDADE DE MIRNA .....	15
5. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	16
6. CONCLUSÃO.....	17
7. REFERÊNCIAS .....	18
8. ANEXO I.....	23

## RESUMO

Os estudos e as biotécnicas desenvolvidas ao longo do tempo possibilitaram o aumento da produtividade dos rebanhos bovinos devido ao aumento da capacidade de selecionar animais geneticamente superiores. Uma das biotecnologias mais empregadas mundialmente, considerada um marco nas técnicas de reprodução animal, é a inseminação artificial (IA). A criopreservação do espermatozoide tem grande importância para o sucesso da IA e, até mesmo, da produção *in vitro* de embriões. A criopreservação convencional do sêmen pode alterar algumas características dos espermatozoides, influenciando sua capacidade de fertilizar o ovócito e interferindo no desenvolvimento embrionário inicial. Porém, ainda não foi avaliada a influência do processo de congelamento de sêmen sobre o conteúdo de micro-RNA (miRNA) dos espermatozoides que, sabidamente, pode interferir no desenvolvimento embrionário inicial. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o processo de congelamento de sêmen bovino altera o conteúdo de miRNAs dos espermatozoides. Utilizou-se o ejaculado de cinco animais, que foram divididos em duas alíquotas. As primeiras alíquotas foram encaminhadas para o procedimento de extração de miRNAs. As segundas alíquotas foram criopreservadas com meio crioprotetor Tris-gema-glicerol e, após duas semanas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e submetidas ao mesmo processo de extração de miRNAs ao qual foram submetidas as primeiras alíquotas. Os miRNAs extraídos foram submetidos a sequenciamento semiquantitativo. Os dados foram avaliados utilizando o programa miRDeep, DESeq2 e edgeR. A partir dos dados obtidos, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas antes e depois do congelamento na quantidade dos 383 miRNAs identificados. Conclui-se que a criopreservação de sêmen bovino utilizando como meio diluente crioprotetor o TRIS-gema-glicerina não altera o conteúdo de miRNAs dos espermatozoides.

Palavras-chave: micro-RNA, espermatozoide, criopreservação seminal, sêmen bovino, touro.

## 1. INTRODUÇÃO

A seleção de animais por mérito genético, a análise da composição do ejaculado e a criação de padrões de qualidade são procedimentos que aumentam a qualidade dos índices reprodutivos e do índice financeiro na pecuária bovina (MELLO *et al.*, 2016). Os avanços observados nas pesquisas relacionadas à reprodução animal têm possibilitado a aceleração do progresso genético, que são de grande importância econômica, além de também contribuir com a preservação de espécies devido à criopreservação e o aprimoramento ou criação de novos produtos e fármacos na área (DE SOUZA, 2007).

Os estudos e as biotécnicas desenvolvidas ao longo do tempo possibilitaram o aumento da produtividade dos rebanhos bovinos devido ao aumento da capacidade de selecionar animais geneticamente superiores. Por isso, técnicas como a aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões (PIVE) são muito estudadas tendo em vista que o objetivo final é simular o ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário sem altas taxas de ineficiência (VARAGO *et al.*, 2008; GARCIA, 2017).

Uma das biotecnologias mais empregadas mundialmente, considerada um marco nas técnicas de reprodução animal, é a inseminação artificial (IA). Epaminondas Alves de Souza foi o primeiro veterinário a publicar um artigo sobre a técnica em equinos no ano de 1912. A aplicação da IA nos rebanhos é uma técnica que traz vantagens quando comparada ao comportamento de monta natural (SEVERO, 2015; BARUSELLI *et al.*, 2019).

O Brasil, em 2002, submetia apenas 5,9% das novilhas e vacas à IA. Porém, em 2021, a Associação Brasileira de Inseminação Artificial relatou que o país ultrapassou a média mundial de 22%, totalizando 23,4% de animais submetidos à IA (THIBIER; WAGNER, 2022; ASBIA, 2021).

Outro processo de grande importância para o sucesso da produção *in vitro* de embriões e IA é a criopreservação do espermatozoide bovino. A descoberta do glicerol como crioprotetor em 1949 foi um avanço muito importante quando se trata de manter as características essenciais dos gametas durante o processo de congelamento e descongelamento (HOLT, 2000). Apesar da criopreservação conseguir proteger organelas e processos metabólicos importantes dos espermatozoides, fatores como

a capacitação prematura (CORMIER *et al.*, 1997), a baixa motilidade espermática, o dano no metabolismo mitocondrial, a inviabilidade da célula e a fragmentação do DNA (O'CONNELL *et al.*, 2002) que poderiam ocorrer no processo de congelamento do sêmen são determinantes para o sucesso da PIVE, tendo em vista que o zigoto precisa ser viável para implantação e esses fatores podem diminuir a capacidade de fertilidade desse gameta (LOUTRADI *et al.*, 2006).

Os espermatozoides são células gaméticas que possuem cromatina altamente compactada e são condutores metabolicamente funcionais do genoma masculino durante a fertilização (CARREL, 2012; BELETTI, 2013). O núcleo espermático possui vários tipos de micro-RNAs (miRNAs) que podem ter sido produzidos durante espermatogênese quando as histonas substituídas por protaminas. (BLOCH, 1969).

Além disso, microvesículas liberadas pelo epitélio epididimário, conhecidas como epididimossomos, também são responsáveis pelo carregamento de miRNAs para os espermatozoides. Esses epididimossomos, juntamente com outras substâncias, participam da maturação dos espermatozoides no epidídimo durante a espermatogênese (NIXON *et al.*, 2015; HOOG; LOTVALL, 2015; LUNAVAT, 2015; OZKOCER; KONAC, 2021).

Os miRNAs são um dos fatores reguladores de expressão gênica do organismo. Com moléculas de aproximadamente 22 ribonucleotídeos não codificantes, estão presentes na cromatina dos espermatozoides e tem como função o pareamento e a degradação de RNAs mensageiros (mRNA). (BARTEL, 2004; TAY *et al.*, 2008; OLIVEIRA-CARVALHO *et al.*, 2011).

Apesar de serem conhecidas algumas das funções dos miRNAs em células somáticas, pouco se sabe sobre sua função nos espermatozoides, mas sabe-se que tais RNAs influenciam no desenvolvimento embrionário inicial (BELETTI, 2013; SOUZA, 2019). Sabendo-se que a criopreservação convencional do sêmen pode alterar algumas características dos espermatozoides, influenciando sua capacidade de fertilização do ovócito e interferindo no desenvolvimento embrionário inicial (BAILEY, 2003), este estudo pretende avaliar a influência do processo de congelamento de sêmen bovino no conteúdo de miRNAs do espermatozoide.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. ESPERMATOZOIDE

O espermatozoide dos mamíferos foi descoberto por Van Leeuwenhoek em 1677 e inicialmente chamado de "animalacula" (PESCH; BERGMANN, 2006). Historicamente conhecido como carreador do material genético masculino, o espermatozoide é haploide e em humanos, contribui com 23 cromossomos, que no processo reprodutivo se une aos 23 cromossomos do ovócito, gameta feminino (CARREL, 2012). As células somáticas de bovino possuem 30 cromossomos (15 pares), logo os espermatozoides bovinos possuem 15 cromossomos (CHAGIN *et al.*, 2018). Consideravelmente menor que o ovócito, o gameta masculino não é simples e compõe-se por três regiões principais: cabeça, peça intermediária e cauda (PESCH; BERGMANN, 2006).

Na cabeça é possível identificar o núcleo, responsável por armazenar o material genético. O DNA é compactado no núcleo para facilitar o transporte e as propriedades aerodinâmicas, bem como limitar a transcrição do DNA para facilitar a fertilização (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2007). Junto ao núcleo, que ocupa a maior parte da célula, localiza-se o acrossomo. Responsável pelo armazenamento de enzimas hidrolíticas, o acrossomo é importante para a penetração do gameta masculino na zona pelúcida, e também um dos responsáveis pela interação espermatozoide-ovócito de capacitação do esperma para torná-lo apto a fecundação (YANAGIMACHI, 1994; RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2007).

Enquanto a cauda é composta por um axonema formado de citoesqueleto com nove pares de microtúbulos em torno do par central (estrutura 9+2), a peça intermediária entre a cabeça e cauda é composta por uma bainha mitocondrial onde a adenosina trifosfato (ATP) é gerada após fosforilação oxidativa para a energização capaz de movimentar todo o flagelo e facilitar a locomoção no ejaculado. (MORTIMER, 2000; LEITE, 2008; GAFFNEY *et al.*, 2011).

Os espermatozoides se locomovem em um líquido conhecido como plasma seminal. Composto por secreções testiculares, epididimárias, das vesículas seminais, da próstata e de outras glândulas sexuais, o plasma seminal possui substâncias que modulam a motilidade espermática, a capacitação espermática e a reação acrossomal

responsável pela fertilização do ovócito e a viabilidade celular do espermatozoide (MANJUNATH *et al.*, 2007).

## **2.2. ESPERMATOGÊNESE**

A espermatogênese é o processo de formação dos gametas masculinos (espermatozoides) que se dá nos túbulos seminíferos no interior dos testículos. A partir da multiplicação e diferenciação, os gonócitos que são as primeiras células reprodutoras se transformam em espermatogônias A que subsequentemente sofrem mitose e dão origem às espermatogônias B. Ao chegarem no tipo celular espermatogônias B a fase proliferativa cessa e dá início a prófase I do processo de meiose I, gerando espermatócitos primários que após a primeira divisão da meiose formam espermatócitos secundários e em mais uma divisão meiótica formam as espermatídes arredondadas. Espermatídes são células haploides que passam pelo processo seguinte de espermiogênese, responsável pela diferenciação e formação das estruturas características dos espermatozoides, como os flagelos, acrossomo e membrana nuclear (AGUIAR *et al.*, 2006; KOTAJA, 2014).

Indispensável para transmitir a carga genética masculina durante a fertilização, a espermatogênese é regulada por milhares de genes que influenciam diretamente na fertilidade (LEGRAND; HOBBS, 2018), sendo os micro-RNAs essenciais para a formação adequada dos gametas garantindo o sucesso do desenvolvimento embrionário inicial (KOTAJA, 2014; BELETTI, 2013, SOUZA, 2019).

O epidídimo, estrutura importante no trato reprodutivo masculino, é responsável pelo processo de maturação final do espermatozoide. As microvesículas conhecidas com epididimossomos carregam diversos conteúdos produzidos pelo epitélio, inclusive miRNAs, que possuem alvos em várias etapas da formação dos espermatozoides, na fertilização e no desenvolvimento embrionário (HOOG; LOTVALL, 2015; JERCZYNSKI *et al.*, 2016; SOUZA 2019).

## **2.3. CRIOPRESERVAÇÃO E MICRO-RNA**

O congelamento de sêmen consiste em uma técnica com objetivo de armazenar e preservar amostras de sêmen para serem usadas futuramente e é uma

ferramenta importante no aceleração do processo de melhoramento genético (AMIRAT *et al.*, 2004). Compreender e estudar a criopreservação auxilia no aumento da produtividade, já que a técnica adequada é decisiva para um desenvolvimento embrionário inicial normal. Isso porque a técnica correta evita a danificação de organelas e membranas, além de evitar interferências na capacitação e maturação espermática, assim como na reação acrossomal (WATSON, 1995; GARNER *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2003).

Os miRNAs são moléculas não codificantes de RNA responsáveis por impedir a tradução de alguns RNA-mensageiro (mRNA) através de processos inibidores ou degradadores (VASHISHT; GAHLAY, 2020; MELLO, 2007). Os espermatozoides possuem muitos miRNAs capazes de regular a transcrição e síntese de proteínas importantes para o sucesso da reprodução (RODGERS *et al.*, 2013). Sendo assim, pode-se analisar a fertilidade de machos usando esses miRNA como biomarcadores do desenvolvimento embrionário inicial e o grau de fertilidade desses machos (GOVINDARAJU *et al.*, 2012).

Sabendo que a criopreservação convencional do sêmen pode alterar algumas características dos espermatozoides e influenciar sua capacidade de fertilização do ovócito e no desenvolvimento embrionário inicial, a análise do conteúdo de miRNAs antes e depois do processo de criopreservação seminal se mostra relevante.

### **3. OBJETIVO**

Avaliar o processo de congelamento e preservação do sêmen bovino na influência do conteúdo de miRNAs nos espermatozoides.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. AMOSTRAS DE SÊMEN**

Foram utilizadas cinco amostras de sêmen, coletadas através do método de eletroejaculação, de dois touros da raça Girolando, oriundos da fazenda Capim Branco da Universidade Federal de Uberlândia e outros três touros da raça Guzerá, oriundos da fazenda experimental da Universidade de Uberaba. Imediatamente após

a coleta, metade de cada amostra (ejaculado) foi direcionada ao laboratório para análise dos miRNAs e outra metade foi diluída no meio TRIS-gema (2,5% (p/v) de TRIS (hidroximetil amino metano), 20,0% (v/v) de gema de ovo, 1,3% (p/v) de ácido cítrico, 1,0% (p/v) de frutose, 0,13% (v/v) de sulfato de gentamicina, em água destilada, pH 7.4) na proporção de um para um, com o intuito de manter os espermatozoides viáveis ao decorrer do processamento. Assim, após contagem de células por uma câmara de *Neubauer*, as amostras foram novamente diluídas e padronizadas em uma concentração de 80 milhões de espermatozoides por mL de meio Tris-gema adicionado de glicerol (6,5% (v/v)) e posteriormente envasadas em palhetas de 0,5 mL. Posteriormente, essas foram congeladas automaticamente em congelador TK (Uberaba, MG, Brasil) modelo 3000 Compacta, através da curva de congelamento P1S2 (0,5 °C/ minuto até atingir 5 °C, 20 °C/ minuto até -120 °C, seguido de imersão total em N<sub>2</sub> líquido). Após esse processo, as palhetas congeladas foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C por dois meses para posteriormente serem avaliadas quanto ao seu conteúdo de miRNAs (LUCIO *et al.*, 2016)

#### **4.2. SELEÇÃO ESPERMÁTICA E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Tanto as amostras de sêmen frescas como as congeladas utilizadas para o processo de isolamento dos miRNAs, foram submetidas ao processo de seleção espermática por gradiente de *Percoll* (AVERY; GREVE, 1995), com objetivo de purificá-las de quaisquer contaminantes como células somáticas, espermatozoides patológicos e diluente.

Para a seleção espermática, as palhetas de sêmen foram descongeladas em um banho maria a 37° por 40 segundos, depositadas em um tubo de 15 mL sobre a solução contendo 1 mL de *Percoll* a 45% e 1 mL de *Percoll* a 90%, ambas as concentrações diluídas em meio Sperm-Talp, previamente estabilizado por 2 horas em uma estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1400 x g por 30 min, levando à formação de um *pellet* de espermatozoides viáveis. Para a retirada do *Percoll*, o sobrenadante do tubo foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 0,5 mL de *phosphate buffered saline* (PBS), e assim a solução foi novamente centrifugada a 1400 x g por 20 min. Logo após, esta etapa foi repetida mais duas vezes.

### 4.3. ISOLAMENTO DE miRNA

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

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

### 4.4. SEQUENCIAMENTO DE RNAs (RNA-SEQ)

As amostras de miRNA foram submetidas a construção de biblioteca utilizando o kit RealSeq®-AC (Small RNA SomaGenics®) conforme instruções do fabricante e a fração correspondente aos pequenos RNAs foi purificada em gel. As bibliotecas foram sequenciadas utilizando a IlluminaNextSeq™ 500 V2 high-output 75 ciclos conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram filtradas por qualidade utilizando o *software FastQC* e as *reads* com *score* de qualidade menor que 25 foram contadas e descartadas. Para eliminação dos adaptadores, as *reads* foram

processadas utilizando o *software Trimmomatic*. Todas as sequências foram contadas e mapeadas no genoma de *Bos taurus*.

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

#### **4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-RNAS NAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS**

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

#### **4.6. ANÁLISE DE POSSÍVEIS DIFERENÇAS NA QUANTIDADE DE miRNA**

Para a análise de diferenças entre antes e depois do congelamento e descongelamento 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. As amostras foram distribuídas em dois grupos: antes e depois do congelamento. Em seguida foi realizada a normalização das bibliotecas de contagem para cada amostra

por funções do próprio edgeR ou DESeq2, foi estabelecida uma amostra como referência, estimou-se os coeficientes de dispersão, realizou-se os testes estatísticos para cada par de amostras comparadas e filtrou-se os miRNAs com baixa contagem normalizada pelo *software* HTSFilter. Foi então verificada a existência de possíveis diferenças entre os dois grupos e aqueles miRNAs com valor de “p” estatístico ajustado menor que “0.05” (FDR < 0.05 edgeR e *padj-value* < 0.05 DESeq2), bem como valores de *logFoldChange* > 1 ou < -1 seriam considerados quantidade diferente entre as amostras comparadas para cada condição.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Após o processamento das amostras e sequenciamento foram identificados 383 miRNAs, cuja relação se encontra listada no Anexo I.

Nem todo miRNA foi encontrado em todas as amostras, demonstrando existir variabilidade de miRNAs entre os animais. Alguns miRNAs tiveram seu valor numérico aumentado ou apareceram apenas após o congelamento. Também existiram miRNAs que apresentaram valores numéricos maiores antes em relação à depois do congelamento. Isso que poderia ser explicado por imprecisão da metodologia de isolamento, purificação e avaliação dos miRNAs, ou por degradação provocada pela criopreservação, onde a retirada de um ou mais nucleotídeos, podem transformar um miRNA em outro. No caso de surgimento de miRNAs posterior ao congelamento, há também a possibilidade de contaminação de RNAs oriundos da gema utilizada no meio de congelamento, visto que o ovo possui grande quantidade de miRNAs (WADE *et al.*, 2016). É importante salientar que em todos esses casos a diferença na quantidade ou presença de miRNA é mínima, contribuindo para essas possíveis explicações.

De qualquer maneira, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas antes e depois do congelamento na quantidade de qualquer miRNA.

A priori era realmente esperado que não ocorresse alterações expressivas no conteúdo de miRNA após o congelamento e descongelamento do sêmen, visto que, frequentemente em laboratórios de biologia molecular é utilizado o congelamento para preservar amostras de RNA por períodos relativamente longos, apesar de sua eficiência ser questionável (SVENSSON *et al.*, 2017).

No entanto, no congelamento para preservação de amostras de RNA para biologia molecular geralmente são usadas substâncias que estabilizam essa molécula, tais como *RNAlater*<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) e trizol, e no meio diluente utilizado para criopreservação, não existe qualquer estabilizante de RNA (LUCIO *et al.*, 2016). Isso poderia levar a alterações provocadas pelo congelamento, conforme observado em bovino por Shangguan *et al.* (2020) e em suíno Zhang *et al.* (2017).

A criopreservação de sêmen de suíno não possui a mesma eficiência do que a de sêmen bovino, diminuindo intensamente a qualidade dos espermatozoides após o processo (GROßFELD *et al.*, 2008). Portanto, se a fisiologia e morfologia espermática dos espermatozoides de suíno são alteradas durante a criopreservação, são compreensíveis as alterações nos miRNAs encontradas por Zhang *et al.* (2017).

No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas no conteúdo de miRNA em espermatozoides de touro congelados, ao contrário do observado por Shangguan *et al.* (2020). Isso pode ser devido ao número de amostras (cinco e três respectivamente), meio crioprotetor, curva de congelamento e metodologias de isolamento, purificação e avaliação dos miRNAs utilizados terem sido diferentes.

## **6. CONCLUSÃO**

Conclui-se que a criopreservação de sêmen bovino utilizando como meio diluente crioprotetor o TRIS-gema-glicerina e utilizando a curva de congelação 0,5 °C/ min. até atingir -5 °C, 20 °C/ min. até -120 °C, seguido de imersão total em N<sub>2</sub> líquido não altera o conteúdo de miRNAs dos espermatozoides.

## 7. REFERÊNCIAS

A. SHANGGUAN, H. ZHOU, W. SUN, R. DING, X. LI, J. LIU, Y. ZHOU, X. CHEN, F. DING, L. YANG, S. ZHANG. *Cryopreservation induces alterations of miRNA and mRNA fragment profiles of bull sperm*. **Front. Genet.**, 11, p. 419, 2020.

AGUIAR, G. V., ARAÚJO, A. A., & MOURA, A. DE A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Ver. Brasi. de Zoot.**, v. 35, n. 4, p. 1629–1638, 2006.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O. Courtens, L.J.; ANTON, M. *Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with OptidylÒ, a commercial egg yolk extender*. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index ASBIA Mercado, 2021. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2022/02/Index-Asbia-2021-M%C3%ADdia>. Acesso em: 01/09/2022.

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of PERCOLL® on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. **Theriogenology**, v. 44, p.871-878, 1995.

BARTEL, D. P. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. **Cell**, v.116, p.281-297, 2004.

BARUSELLI *et al.* Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.43, n.2, p.308-314, 2019.

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.37, n.2, p.92-96, 2013.

BLOCH D. P. *A catalog of sperm histones*. **Genetics**, v.61, p.93-111, 1969.

CARREL, D. T. *Epigenetics of the male gamete*. **Fertil Steril**, v.97, p.267-274, 2012.

CHAGIN, V., ZALENSKY, A.; NAZAROV, I.; MUDRAK, O. Preferable location of chromosomes 1, 29, and X in bovine spermatozoa. **AIMS Genet.**, v.5, n.2. p.113-123, 2018.

CORMIER, N. *et al.* *Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation*. **J. Androl.** v. 18, p. 461–468, 1997.

CORMIER, N., BAILEY, J. L. *A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation- induced capacitation of bovine spermatozoa*. **Biol. Reprod.**, 2003.

DE SOUZA, L. C. **Transferência de embrião e fertilização “in vitro” (FIV) em bovinos**. p. 85, Tese (Conclusão de Curso), Curso de Medicina Veterinária, Universidade Castelo Branco, 2007.

GAFFNEY, E. A. *et al.*, Mammalian Sperm Motility: Observation and Theory. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 43, n. 1, p. 501–528, 2011.

GARCIA, S. M. Avaliação da taxa de blastocisto e prenhez de embriões produzidos in vitro em decorrência da contagem de folículos antrais em vacas da raça Girolando. **Rev. Acad. Ciência Animal**, v. 15, n. 2, p.67-67, 2017.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G.; *et al.* *Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm*. **Theriogenology**., v. 56, p.31-40, 2001.

GOVINDARAJU *et al.* *Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa*. **Reprod. Biology and Endocrinology**., v. 10, n. 82, 2012.

GROßFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; W.M.C. MAXWELL, W.M.C. *Rath New aspects of boar semen freezing strategies*. **Theriogenology**, v. 70, p. 1225–1233, 2008.

HOLT, W. V. *Basic aspects of frozen storage of sêmen*. **Anim. Reprod. Science**, v. 62, p. 3–22, 2000.

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.

JERCZYNSKI, O.; LACROIX-PÉPIN, N.; BOILARD, E.; CALVO, E.; BERNET, A.; FORTIER, M.A.; BJORKGREN, I.; SIPILA, P.; BELLEANNÉE. *Role of Dicer1-dependent factors in the paracrine regulation of epididymal gene expression*. **Plos One**, v. 11, n. 10, p.1-26, 2016.

KOTAJA, N. (2014). *MicroRNAs and spermatogenesis*. **Fertility and Sterility**, 101(6), 1552–1562. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.04.

KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. *The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines*. **Cryobiology**., v.46, p.24-53, 2003.

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

LEITE, T. G., Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de 126 integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro. 2008. 121p. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2008.**

LOUTRADI, K. E. *et al. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 23, p. 69–74, 2006.*

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

LUNAVAT, T. R., CHENG, L., KIM, D. K., BHADURY, J., JANG, S. C., LASSER, C. *et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells—Evidence of unique microRNA cargos. **RNA Biol.** 12, 810–823 (2015).*

MANJUNATH, P. *et al. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Society of Reprod. and Fertility supplement**, v. 65, p. 217, 2007.*

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

MELLO, R. R. C. *et al. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. de Reprod. Anim.** v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016*

MORTIMER, S. T. *Casa- Practical aspects. **J. Androl**, p. 515-524, 2000.*

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.*

O'CONNELL, M. *et al.* *The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function.* **Hum. Reprod.** v. 17, p. 704–709, 2002.

OLIVEIRA-CARVALHO, V. *et al.* MicroRNAs: Um Novo Paradigma no Tratamento e Diagnóstico da Insuficiência Cardíaca? **Arq. Cardiol.** V. 98, n. 4, p. 362-370, 2012

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.

PESCH, S., BERGMANN, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, 37(7), 597–612.

RAMALHO-SANTOS, J. *et al.* *Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy.* **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**, p.397 – 402, 2007.

RODGERS, A. B., MORGAN, C. P., BRONSON, S. L., REVELLO, S., BALE, T. L. *Paternal Stress Exposure Alters Sperm MicroRNA Content and Reprograms Offspring HPA Stress Axis Regulation.* **Journal of Neuroscience**, v.33, n.21, p.9003-9012, 2013.

SEVERO, N. C. História da inseminação artificial no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.17-21, jan./mar. 2015.

SOUZA, G. L. I. **Micro-RNAs espermáticos correlacionados com a fertilização e desenvolvimento inicial de embriões bovinos (*bos taurus*) in vitro**, *Dissertação Mestrado* Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

SVENSSON, V., VENTO-TORMO, R. & TEICHMANN, S. *Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade.* **Nat Protoc** 13, 599–604, 2018.

TAY, Y. *et al.* *MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation.* **Nature**, v.455, p.1124-1128, 2008.

THIBIER, M.M., WAGNER, H. G. *World Statistics for artificial insemination in cattle.* **Livest Prod Sci**, v.74, n.2, p.203- 2012, 2002.

VARAGO, F. C. *et al.* Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.32, p.100-109, 2008.

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

WADE, B. *et al. Isolation and detection of microRNA from the egg of chickens*. **BMC Res Notes**, 2016.

WATSON, P. F. *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. **Reprod. Fertility Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

Y. ZHANG, D. DAI, Y. CHANG, Y. LI, M. ZHANG, G. ZHOU, Z. PENG, C. ZENG. *Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression*. **Cryobiology**, 76, pp. 24-33, 2017.

YANAGIMACHI, R., *The Physiology of Reproduction*. **Raven Press**, E. Knobil, J. D. Neill (Eds.), p. 189-317, 1994.

## 8. ANEXO I

bta-let-7-a-3p_MIMAT0004330
bta-let-7-a-5p_MIMAT0003844
bta-let-7b_MIMAT0004331
bta-let-7c_MIMAT0004332
bta-let-7d_MIMAT0003810
bta-let-7e_MIMAT0004333
bta-let-7f_MIMAT0003519
bta-let-7g_MIMAT0003838
bta-let-7i_MIMAT0003851
bta-miR-10020_MIMAT0040419
bta-miR-100_MIMAT0009215
bta-miR-10167-3p_MIMAT0040914
bta-miR-10172-5p_MIMAT0040920
bta-miR-10174-3p_MIMAT0040928
bta-miR-10183-5p_MIMAT0040942
bta-miR-101_MIMAT0003520
bta-miR-103_MIMAT0003521
bta-miR-106a_MIMAT0003784
bta-miR-106b_MIMAT0009218
bta-miR-107_MIMAT0003785
bta-miR-10a_MIMAT0003786
bta-miR-10b_MIMAT0003839
bta-miR-11971_MIMAT0046336
bta-miR-11972_MIMAT0046341
bta-miR-11975_MIMAT0046354
bta-miR-11976_MIMAT0046357
bta-miR-11980_MIMAT0046368
bta-miR-11981_MIMAT0046370
bta-miR-11986b_MIMAT0046621
bta-miR-11987_MIMAT0046387
bta-miR-11988_MIMAT0046393
bta-miR-11995_MIMAT0046648
bta-miR-12023_MIMAT0046716
bta-miR-12030_MIMAT0046723
bta-miR-12034_MIMAT0046727
bta-miR-12056_MIMAT0046763
bta-miR-12057_MIMAT0046764
bta-miR-1224_MIMAT0009944
bta-miR-122_MIMAT0003849
bta-miR-1246_MIMAT0024567
bta-miR-1249_MIMAT0009976

bta-miR-124a_MIMAT0003811_bta-miR-124b_MIMAT0013774
bta-miR-125a_MIMAT0003538
bta-miR-125b_MIMAT0003539
bta-miR-1260b_MIMAT0024568
bta-miR-126-3p_MIMAT0003540
bta-miR-126-5p_MIMAT0004328
bta-miR-1271_MIMAT0009975
bta-miR-1277_MIMAT0024569
bta-miR-127_MIMAT0003787
bta-miR-128_MIMAT0003541
bta-miR-1291_MIMAT0009956
bta-miR-129-3p_MIMAT0009222
bta-miR-1306_MIMAT0009974
bta-miR-1307_MIMAT0009969
bta-miR-130a_MIMAT0009223
bta-miR-130b_MIMAT0009224
bta-miR-132_MIMAT0003812
bta-miR-133a_MIMAT0009225
bta-miR-135a_MIMAT0009228
bta-miR-135b_MIMAT0009229
bta-miR-136_MIMAT0009230
bta-miR-137_MIMAT0009231
bta-miR-1388-5p_MIMAT0013590
bta-miR-138_MIMAT0003813
bta-miR-139_MIMAT0003788
bta-miR-140_MIMAT0003789
bta-miR-141_MIMAT0009232
bta-miR-142-3p_MIMAT0003791
bta-miR-142-5p_MIMAT0003790
bta-miR-143_MIMAT0009233
bta-miR-145_MIMAT0003542
bta-miR-146a_MIMAT0009236
bta-miR-146b_MIMAT0009235
bta-miR-147_MIMAT0009237
bta-miR-148a_MIMAT0003522
bta-miR-148b_MIMAT0003814
bta-miR-150_MIMAT0003845
bta-miR-151-3p_MIMAT0003524
bta-miR-151-5p_MIMAT0003523
bta-miR-152_MIMAT0009238
bta-miR-153_MIMAT0009239
bta-miR-154a_MIMAT0009240
bta-miR-154c_MIMAT0025542

bta-miR-155_MIMAT0009241
bta-miR-1584-5p_MIMAT0011969
bta-miR-15a_MIMAT0004334
bta-miR-15b_MIMAT0003792
bta-miR-16a_MIMAT0009242
bta-miR-16b_MIMAT0003525
bta-miR-17-3p_MIMAT0003816
bta-miR-17-5p_MIMAT0003815
bta-miR-1777a_MIMAT0012032
bta-miR-1777b_MIMAT0012046
bta-miR-181a_MIMAT0003543
bta-miR-181b_MIMAT0003793
bta-miR-181c_MIMAT0003817
bta-miR-181d_MIMAT0009243
bta-miR-182_MIMAT0009244
bta-miR-1839_MIMAT0009968
bta-miR-183_MIMAT0009245
bta-miR-184_MIMAT0009246
bta-miR-185_MIMAT0009247
bta-miR-186_MIMAT0003818
bta-miR-187_MIMAT0009248
bta-miR-18a_MIMAT0003526
bta-miR-18b_MIMAT0003517
bta-miR-190a_MIMAT0009251
bta-miR-190b_MIMAT0009252
bta-miR-191_MIMAT0003819
bta-miR-192_MIMAT0003820
bta-miR-193-a-3p_MIMAT0003795
bta-miR-193b_MIMAT0009253
bta-miR-1949_MIMAT0046755
bta-miR-194_MIMAT0009254
bta-miR-195_MIMAT0004335
bta-miR-196a_MIMAT0009255
bta-miR-196b_MIMAT0009256
bta-miR-197_MIMAT0009257
bta-miR-199-a-3p_MIMAT0003746
bta-miR-199c_MIMAT0011871
bta-miR-19a_MIMAT0004336
bta-miR-19b_MIMAT0004337
bta-miR-1_MIMAT0009214
bta-miR-200a_MIMAT0003822
bta-miR-200b_MIMAT0003842
bta-miR-200c_MIMAT0003823
bta-miR-202_MIMAT0009259

bta-miR-204_MIMAT0004338
bta-miR-205_MIMAT0003545
bta-miR-206_MIMAT0009260
bta-miR-20a_MIMAT0003527
bta-miR-20b_MIMAT0003796
bta-miR-211_MIMAT0009263
bta-miR-212_MIMAT0009264
bta-miR-215_MIMAT0003797
bta-miR-21-5p_MIMAT0003528
bta-miR-216b_MIMAT0009266
bta-miR-217_MIMAT0009267
bta-miR-219-3p_MIMAT0012547
bta-miR-221_MIMAT0003529
bta-miR-222_MIMAT0003530
bta-miR-223_MIMAT0009270
bta-miR-22-3p_MIMAT0012536
bta-miR-224_MIMAT0009271
bta-miR-22-5p_MIMAT0003826
bta-miR-2284aa_MIMAT0025560
bta-miR-2284ab_MIMAT0030437
bta-miR-2284a_MIMAT0011906
bta-miR-2284b_MIMAT0011983
bta-miR-2284c_MIMAT0011926
bta-miR-2284d_MIMAT0011836
bta-miR-2284e_MIMAT0012080
bta-miR-2284-h-5p_MIMAT0012019
bta-miR-2284k_MIMAT0011907
bta-miR-2284l_MIMAT0011824
bta-miR-2284m_MIMAT0011976
bta-miR-2284o_MIMAT0012068
bta-miR-2284p_MIMAT0011885
bta-miR-2284q_MIMAT0011957
bta-miR-2284v_MIMAT0011937
bta-miR-2284w_MIMAT0017393
bta-miR-2284x_MIMAT0017395
bta-miR-2284y_MIMAT0024579
bta-miR-2284z_MIMAT0025559
bta-miR-2285aa_MIMAT0030435
bta-miR-2285ab_MIMAT0030436
bta-miR-2285ac_MIMAT0030440
bta-miR-2285ad_MIMAT0030446
bta-miR-2285aj-5p_MIMAT0040947
bta-miR-2285al-5p_MIMAT0040949
bta-miR-2285ap_MIMAT0046362

bta-miR-2285as_MIMAT0046338
bta-miR-2285at_MIMAT0046342
bta-miR-2285au_MIMAT0046346
bta-miR-2285av_MIMAT0046347
bta-miR-2285aw_MIMAT0046348
bta-miR-2285ba_MIMAT0046373
bta-miR-2285bf_MIMAT0046382
bta-miR-2285bg_MIMAT0046386
bta-miR-2285bl_MIMAT0046623
bta-miR-2285b_MIMAT0011833
bta-miR-2285bn_MIMAT0046625
bta-miR-2285bo_MIMAT0046627
bta-miR-2285bp_MIMAT0046633
bta-miR-2285bq_MIMAT0046635
bta-miR-2285bw_MIMAT0046643
bta-miR-2285by_MIMAT0046645
bta-miR-2285bz_MIMAT0046646
bta-miR-2285cf_MIMAT0046663
bta-miR-2285cl_MIMAT0046681
bta-miR-2285c_MIMAT0011950
bta-miR-2285cm_MIMAT0046682
bta-miR-2285co_MIMAT0046686
bta-miR-2285cp_MIMAT0046687
bta-miR-2285cu_MIMAT0046698
bta-miR-2285di_MIMAT0046746
bta-miR-2285e_MIMAT0024580
bta-miR-2285f_MIMAT0024581
bta-miR-2285g_MIMAT0024582
bta-miR-2285i_MIMAT0024584
bta-miR-2285j_MIMAT0024585
bta-miR-2285k_MIMAT0024586
bta-miR-2285l_MIMAT0024587
bta-miR-2285m_MIMAT0025533
bta-miR-2285n_MIMAT0025531
bta-miR-2285q_MIMAT0025574
bta-miR-2285s_MIMAT0025576
bta-miR-2285u_MIMAT0031094
bta-miR-2285v_MIMAT0025579
bta-miR-2285x_MIMAT0029946
bta-miR-2299-3p_MIMAT0011808
bta-miR-2299-5p_MIMAT0011807
bta-miR-2305_MIMAT0011817
bta-miR-2320-3p_MIMAT0011845
bta-miR-2320-5p_MIMAT0011844

bta-miR-2332_MIMAT0011865
bta-miR-2336_MIMAT0011869
bta-miR-2342_MIMAT0011877
bta-miR-2346_MIMAT0011881
bta-miR-2363_MIMAT0011901
bta-miR-2367-3p_MIMAT0011910
bta-miR-2367-5p_MIMAT0011909
bta-miR-2397-3p_MIMAT0011952
bta-miR-2399-3p_MIMAT0011955
bta-miR-23a_MIMAT0003827
bta-miR-23-b-3p_MIMAT0003852
bta-miR-2411-5p_MIMAT0011972
bta-miR-2419-5p_MIMAT0011985
bta-miR-2435_MIMAT0012007
bta-miR-24-3p_MIMAT0003840
bta-miR-2450c_MIMAT0012028
bta-miR-2453_MIMAT0012034
bta-miR-2463_MIMAT0012050
bta-miR-2468_MIMAT0012058
bta-miR-2478_MIMAT0012070
bta-miR-2483-3p_MIMAT0012076
bta-miR-2483-5p_MIMAT0012075
bta-miR-2484_MIMAT0012077
bta-miR-24_MIMAT0009250
bta-miR-25_MIMAT0003853
bta-miR-26a_MIMAT0003516
bta-miR-26b_MIMAT0003531
bta-miR-27-a-3p_MIMAT0003532
bta-miR-27b_MIMAT0003546
bta-miR-2881_MIMAT0013839
bta-miR-2887_MIMAT0013845
bta-miR-28_MIMAT0009272
bta-miR-2904_MIMAT0013862
bta-miR-296-3p_MIMAT0009273
bta-miR-296-5p_MIMAT0026918
bta-miR-29a_MIMAT0003518
bta-miR-29b_MIMAT0003828
bta-miR-29c_MIMAT0003829
bta-miR-29-d-3p_MIMAT0009275
bta-miR-29-d-5p_MIMAT0026919
bta-miR-29e_MIMAT0009953
bta-miR-301a_MIMAT0009276
bta-miR-301b_MIMAT0009277
bta-miR-302a_MIMAT0009278

bta-miR-302b_MIMAT0009280
bta-miR-302d_MIMAT0009279
bta-miR-30-a-5p_MIMAT0003841
bta-miR-30-b-5p_MIMAT0003547
bta-miR-30c_MIMAT0003850
bta-miR-30d_MIMAT0003533
bta-miR-30-e-5p_MIMAT0003799
bta-miR-30f_MIMAT0009282
bta-miR-3141_MIMAT0024573
bta-miR-31_MIMAT0003548
bta-miR-320a_MIMAT0003534
bta-miR-323_MIMAT0009284
bta-miR-324_MIMAT0009285
bta-miR-32_MIMAT0009283
bta-miR-331-3p_MIMAT0004339
bta-miR-335_MIMAT0009291
bta-miR-338_MIMAT0009292
bta-miR-339a_MIMAT0009293
bta-miR-339b_MIMAT0012038
bta-miR-33a_MIMAT0009294
bta-miR-340_MIMAT0009296
bta-miR-342_MIMAT0003846
bta-miR-3431_MIMAT0017394
bta-miR-3432a_MIMAT0017396
bta-miR-3432b_MIMAT0036976
bta-miR-345-5p_MIMAT0003800
bta-miR-34a_MIMAT0004340
bta-miR-34b_MIMAT0003549
bta-miR-34c_MIMAT0003854
bta-miR-361_MIMAT0003830
bta-miR-362-3p_MIMAT0012548
bta-miR-363_MIMAT0003855
bta-miR-3660_MIMAT0025555
bta-miR-369-3p_MIMAT0003802
bta-miR-371_MIMAT0009301
bta-miR-374a_MIMAT0004342
bta-miR-374b_MIMAT0009302
bta-miR-374c_MIMAT0046394
bta-miR-375_MIMAT0009303
bta-miR-376a_MIMAT0009946
bta-miR-376b_MIMAT0009945
bta-miR-376c_MIMAT0009947
bta-miR-376d_MIMAT0010199
bta-miR-376e_MIMAT0025543

bta-miR-377_MIMAT0009304
bta-miR-378b_MIMAT0025535
bta-miR-378c_MIMAT0025551
bta-miR-378_MIMAT0009305
bta-miR-379_MIMAT0009306
bta-miR-380-3p_MIMAT0003804
bta-miR-382_MIMAT0009308
bta-miR-409a_MIMAT0009310
bta-miR-411a_MIMAT0009312
bta-miR-411-c-5p_MIMAT0025545
bta-miR-421_MIMAT0009314
bta-miR-423-3p_MIMAT0003831
bta-miR-423-5p_MIMAT0012537
bta-miR-424-3p_MIMAT0015304
bta-miR-424-5p_MIMAT0013593
bta-miR-425-3p_MIMAT0003833
bta-miR-425-5p_MIMAT0003832
bta-miR-429_MIMAT0009315
bta-miR-431_MIMAT0009316
bta-miR-449a_MIMAT0009320
bta-miR-449b_MIMAT0009321
bta-miR-449c_MIMAT0009322
bta-miR-449d_MIMAT0011962
bta-miR-450a_MIMAT0003834
bta-miR-451_MIMAT0009323
bta-miR-452_MIMAT0009324
bta-miR-454_MIMAT0009326
bta-miR-455-5p_MIMAT0003835
bta-miR-484_MIMAT0003535
bta-miR-485_MIMAT0009328
bta-miR-487a_MIMAT0003805
bta-miR-487b_MIMAT0003847
bta-miR-497_MIMAT0004343
bta-miR-499_MIMAT0003536
bta-miR-502a_MIMAT0009338
bta-miR-502b_MIMAT0009339
bta-miR-532_MIMAT0003848
bta-miR-539_MIMAT0009342
bta-miR-543_MIMAT0009344
bta-miR-545-3p_MIMAT0003807
bta-miR-545-5p_MIMAT0003806
bta-miR-574_MIMAT0024577
bta-miR-6119-5p_MIMAT0024588
bta-miR-6120-3p_MIMAT0024591

bta-miR-6123_MIMAT0024596
bta-miR-628_MIMAT0009356
bta-miR-6520_MIMAT0025538
bta-miR-6522_MIMAT0025540
bta-miR-6526_MIMAT0025556
bta-miR-6528_MIMAT0025562
bta-miR-6529a_MIMAT0025565
bta-miR-652_MIMAT0024578
bta-miR-6534_MIMAT0025570
bta-miR-6536_MIMAT0025572
bta-miR-660_MIMAT0004344
bta-miR-708_MIMAT0009367
bta-miR-760-3p_MIMAT0022951
bta-miR-767_MIMAT0009375
bta-miR-769_MIMAT0009376
bta-miR-7857-5p_MIMAT0030432
bta-miR-7859_MIMAT0030434
bta-miR-7861_MIMAT0030441
bta-miR-7865_MIMAT0030450
bta-miR-7_MIMAT0003843
bta-miR-873_MIMAT0009377
bta-miR-874_MIMAT0009378
bta-miR-876_MIMAT0009380
bta-miR-885_MIMAT0009382
bta-miR-92a_MIMAT0009383
bta-miR-92b_MIMAT0009384
bta-miR-935_MIMAT0009385
bta-miR-93_MIMAT0003837
bta-miR-9-3p_MIMAT0012549
bta-miR-95_MIMAT0009387
bta-miR-96_MIMAT0009388
bta-miR-98_MIMAT0003809
bta-miR-99-a-3p_MIMAT0012533
bta-miR-99-a-5p_MIMAT0003537
bta-miR-99b_MIMAT0004345