

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

YULIZABETH DANIELA PINTO ROJAS

**O microRNA bta-miR-425-5p ADQUIRIDO PELO ESPERMATOZOIDE
DURANTE O PROCESSO DE MATURAÇÃO NO EPIDÍDIMO**

UBERLÂNDIA

2024

YULIZABETH DANIELA PINTO ROJAS

**O microRNA bta-miR-425-5p ADQUIRIDO PELO ESPERMATOZOIDE
DURANTE O PROCESSO DE MATURAÇÃO NO EPIDÍDIMO**

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
Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Coelho Da
Silveira

UBERLÂNDIA

2024

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

R741m
2024 Rojas, Yulizabeth Daniela Pinto, 1996-
 O microRNA bta-miR-425-5p adquirido pelo espermatozoide durante o processo de maturação no epidídimo [recurso eletrônico] / Yulizabeth Daniela Pinto Rojas. - 2024.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Coorientador: Juliano Coelho da Silveira.

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.2024.5145>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biologia. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-, (Orient.). II. Silveira, Juliano Coelho da, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 573

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



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 04/2024, do PPGBC | | | | |
| Data: | 04 de Setembro de 2024 | Hora de início: | 14:00 hs | Hora de encerramento: | 16:50 hs |
| Matrícula do Discente: | 12222BCE002 | | | | |
| Nome do Discente: | Yulizabeth Daniela Pinto Rojas | | | | |
| Título do Trabalho: | O microRNA bta-mir-425-5p é adquirido pelo espermatozoide durante o processo de maturação no epidídimo | | | | |
| Área de concentração: | Biologia Celular | | | | |
| Linha de pesquisa: | Biologia da Reprodução | | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | MicroRNA espermático 425-5p: origem, importância na fertilização e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos | | | | |

Reuniu-se, por Videoconferência, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas/PPGBC, assim composta: Professores Doutores: **André Belico de Vasconcelos** - UNIUBE; **Bellisa de Freitas Barbosa** – UFU; e **Marcelo Emílio Beletti** orientador da candidata.

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

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

Aprovada.

Esta defesa faz 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 04/09/2024, às 18:26, 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 **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/09/2024, às 23:23, 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 **André Belico de Vasconcelos, Usuário Externo**, em 05/09/2024, às 09:45, 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 **5663250** e o código CRC **AA522EE7**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por guiar meus passos e abrir as portas onde vou e por permitir-me concluir este trabalho.

Agradeço ao professor Marcelo Emílio Beletti por me permitir fazer parte de seu laboratório, por sua boa orientação, seus bons conselhos e por me dar a oportunidade de ampliar meus conhecimentos no Brasil.

Também agradeço ao professor Juliano Coelho Da Silveira por me receber de braços abertos em seu laboratório LMMD, pela boa amizade e por dedicar seu tempo para alcançar melhores resultados com meus experimentos.

Agradeço o apoio e as risadas com meus colegas e amizades que conheci no Brasil; me ajudaram direta ou indiretamente a ultrapassar este grande desafio, esta experiência não seria a mesma sem cada um deles.

Agradeço aos professores doutores membros da banca de defesa pela disposição em avaliar o presente trabalho; ao PPGBC e ICBIM por fornecer a estrutura dos laboratórios; às agências financiadoras do Brasil, FAPEMIG, CAPES e OEA, por fomentar os recursos necessários para a realização do trabalho e pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu ter dedicação exclusiva à pesquisa.

Agradeço à minha família por me apoiar e confiar em mim, sempre os levarei no meu coração e são o motor da minha persistência. Especialmente agradeço à minha mãe Lourdes e ao meu irmão Julio por me incentivarem em cada momento de fraqueza.

Para toda minha família,
Que cada obstáculo seja visto como uma oportunidade para crescer e
cada dificuldade como um passo mais em direção ao sucesso.

Coisas boas acontecem quando as pessoas fazem mais do que deveriam fazer

Hermann Gmeiner (1919 – 1986)

RESUMO

Os miRNAs desempenham papéis fundamentais na função celular por meio da regulação de diferentes vias. As células espermáticas podem entregar miRNAs ao oócito, modulando os futuros processos epigenéticos do embrião. Em particular, o miR-425-5p descrito como um marcador de proliferação celular e é conhecido por estar presente no esperma. Este trabalho teve como objetivo determinar e quantificar se o bta-miR-425-5p, encontrado no esperma bovino, origina-se da espermatogênese ou é incorporado durante a maturação epididimal. Para isso, testículos de touros foram obtidos de um abatedouro local para obter espermatozoides, vesículas extracelulares e amostras de tecido do parênquima testicular, cabeça, corpo e cauda epididimal de 22 testículos. As amostras foram coletadas por dissecação e lavagem com PBS 1X. As vesículas extracelulares foram caracterizadas por microscopia eletrônica, análise de rastreamento de nanopartículas e citômetro de fluxo. Além disso, foi quantificado a expressão de bta-miR-425-5p por RTq-PCR em vesículas extracelulares, espermatozoides e amostras de tecido do testículo e dos diferentes segmentos epididimários. Os resultados demonstram a presença de vesículas extracelulares e diferenças em tamanho e concentração para cada região. O tamanho das vesículas extracelulares diminuiu, sendo as maiores nos testículos e as menores na cauda epididimal, com maior concentração nos testículos do que nas diferentes regiões do epidídimo. Mesmo na quantificação da expressão de bta-miR-425-5p, foi expresso nos túbulos seminíferos e ductos epididimários, e significativamente diferente nas vesículas extracelulares e esperma da cauda epididimal. De maneira geral, este trabalho demonstrou que o bta-miR-425-5p poderia ser adicionado aos espermatozoides durante a maturação e essa agregação pode ser mediada por vesículas extracelulares.

Palavras-chave: microRNA. miR-425-5p. Espermatozoide. Vesícula extracelular.

ABSTRACT

MiRNAs play key roles in cell function through the regulation of different pathways. Sperm cells can deliver miRNAs to the oocyte modulating the embryo's future epigenetic processes. Particularly miR-425-5p, is well described as a cellular proliferation marker and is known to be present in sperm. This work aimed to determine and quantify whether bta-miR-425-5p, found in bovine sperm, originates from spermatogenesis or is incorporated during epididymal maturation. For that bull, the testis-epididymis complex was obtained from a local slaughterhouse to obtain sperm, extracellular vesicles, and tissue samples from the testicular parenchyma, epididymal head, body, and tail from 22 testes. Samples were collected by dissection and flushing with 1xPBS. Extracellular vesicles were characterized by TEM, nanoparticle tracking analysis, and flow cytometer, in addition, the expression of bta-miR-425-5p in extracellular vesicles, sperm, and tissue samples from different epididymal segments and the testis was quantified by RT-qPCR. The results demonstrate the presence of extracellular vesicles and differ in size and concentration for each region, the size of the extracellular vesicles decreased, the largest in the testis and smallest in the epididymal cauda, with greater concentration in the testicles than in the different regions of the epididymis. Even in quantifying the expression of bta-miR-425-5p, this was expressed in the seminiferous tubules and epididymal ducts, and significantly different expressed in the extracellular vesicles and sperm of the epididymal cauda. Overall, this work demonstrated that bta-miR-425-5p was added to spermatozoa during maturation and this aggregation could be mediated by extracellular vesicles.

Keywords: microRNA. miR-425-5p. Sperm. Extracellular vesicle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espermatogênese. Modelo de organização das células do túbulo seminífero.

Figura 2. Vista esquemática do epidídimo. O epitélio que reveste o epidídimo é composto por vários tipos de células, incluindo células “narrow”, claras, principais e basais.

Figura 3. Representação da biogênese das vesículas extracelulares (VEs) e processos de comunicação com a célula alvo.

Figura 4. Biogêneses de miRNAs, via canonical.

Figura 5. Expressão gênica de bta-miR-425-5p nos túbulos seminíferos e regiões epididimárias (cabeça, corpo e cauda).

Figura 6. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de vesículas extracelulares, isoladas mediante ultracentrifugação do fluido testicular e fluido epididimário de touros.

Figura 7. Distribuição do diâmetro por concentração das vesículas extracelulares (VEs) que foram isoladas a partir do fluido testicular e as regiões do epidídimo.

Figura 8. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) isoladas do epidídimo e testicular por Citometria de fluxo para identificar o marcador Syntenin.

Figura 9. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) isoladas do epidídimo e testicular. Citometria de fluxo para identificar o marcador CD81.

Figura 10. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) isoladas do epidídimo e testicular. Citometria de fluxo para identificar o marcador ALIX.

Figura 11. Citometria de fluxo: verificação da ausência de células nas vesículas extracelulares isoladas de diferentes regiões (testículo, cabeça, corpo e cauda).

Figura 12. Comparação da média e SD do volume testicular.

Figura 13. a) Correlação entre volume testicular e concentração de vesículas extracelulares. b) Correlação entre o volume testicular e o tamanho das vesículas extracelulares.

Figura 14. Diferenças do tamanho entre as VEs do testículo e regiões epididimárias.

Figura 15. Diferenças da concentração entre as VEs do testículo e regiões epididimárias.

Figura 16. Expressão gênica de bta-miR-425-5p nos VEs de fluido testicular e das diferentes regiões do fluido epididimal (cabeça, corpo e cauda).

Figura 17. Coloração panótica rápida feita em esfregaços de espermatozoides antes e após passarem pelo processo de lises de células somáticas.

Figura 18. Microscopia Eletrônica de Transmissão das amostras tratadas com tampão de lises de células somáticas (SCLB)

Figuras 19. Quantificação do bta-miR-425-5p em espermatozoides isolados do testículo e regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda).

Figura 20. Representação da expressão de bta-miR-425-5p no tecido, VEs e espermatozoides.

Tabela 1. Porcentagem de células somáticas antes e após do tratamento com o tampão de lises.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 15 |
| 2.1. Origem e Desenvolvimento dos espermatozoides | 15 |
| 2.2. Maturação dos espermatozoides | 16 |
| 2.2.1. Composição celular do epidídimo: cabeça, corpo, cauda | 17 |
| 2.2.2. Eventos morfológicos e moleculares nos espermatozoides durante a maturação 19 | |
| 2.2.3. Interação do espermatozoide e epitélio no processo de maturação | 21 |
| 2.3. miRNAs nos espermatozoides | 24 |
| 2.3.1. Biologia de miRNAs..... | 24 |
| 2.3.2. miRNA do epitélio seminífero e epididimário | 26 |
| 2.3.3. miRNA nas Vesículas extracelulares (VEs) | 27 |
| 2.3.4. miRNA nos espermatozoides durante o trajeto do túbulo seminífero e ducto epididimário | 27 |
| 2.3.5. bta-miR-425-5p..... | 28 |
| 3. OBJETIVO GENERAL..... | 30 |
| 3.1. Objetivos específicos | 30 |
| 4. MATERIALES E MÉTODOS | 31 |
| 4.1. Obtenção das Amostras Biológicas | 31 |
| 4.2. Coleta de fluido epididimário, fluido testicular e tecidos | 31 |
| 4.2.1. Processamento de fluido epididimário e fluido testicular..... | 32 |
| 4.2.2. Isolamento de Vesículas Extracelulares (VEs) | 32 |
| 4.3. Caracterização de Vesículas Extracelulares | 33 |
| 4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão | 33 |
| 4.3.2. Análise de rastreamento de nanopartícula (NTA) | 34 |
| 4.3.3. Citometria de Fluxo | 34 |
| 4.4. Purificação de Espermatozoides das diferentes regiões e testículo | 35 |
| 4.4.1. Lises de Células Somáticas..... | 35 |
| 4.5. Extração de RNA de Vesículas Extracelulares, Espermatozoides e Tecido | 35 |
| 4.6. Detecção de miR-425-5p em vesículas extracelulares, espermatozoides e tecido das diferentes regiões de epidídimo e testículo | 36 |

| | |
|--|----|
| 4.6.1. Reação em Cadeia da Polimerase (RT-qPCR) | 37 |
| 4.7. Análise estatística..... | 37 |
| 5. RESULTADOS | 38 |
| 5.1. bta-miR-425-5p é expresso nos túbulos seminíferos e regiões epididimárias | 38 |
| 5.2. Presença do bta-miR-425-5p nas VEs | 39 |
| 5.2.1. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) | 39 |
| 5.2.2. Não existem diferenças na concentração e tamanho de vesículas extracelulares no complexo testículo-epidídimo esquerdo e direito | 43 |
| 5.2.3. Diminuição no tamanho e na concentração de vesículas extracelulares nos locais de formação e maturação espermática | 45 |
| 5.2.4. As VEs da cauda epididimal contêm maiores níveis de expressão de bta-miR-425-5p | 47 |
| 5.3. bta-miR-425-5p é diferencialmente expresso nos espermatozoides do epidídimo | 48 |
| 6. DISCUSSÃO | 53 |
| 7. CONCLUSÃO | 58 |
| REFERÊNCIAS | 59 |

1. INTRODUÇÃO

As células germinativas “espermatogônias” passam por diferentes estágios para a formação de espermatozoides, este processo é conhecido como espermatogênese, e acontece nos túbulos seminíferos dos testículos. Depois da formação nos túbulos seminíferos, os espermatozoides passam por processos complexos de maturação pós-testicular no epidídimo (KIERSZENBAUM & TRES, 2016). Durante a maturação, há mudanças no espermatozoide: agregação de moléculas sncRNA (moléculas pequenas de RNA não codificantes - do inglês, “small non coding RNAs”), mudanças na estrutura do flagelo, remoção e aquisição de proteínas da membrana plasmática, migração da gota citoplasmática (BARRACHINA et al, 2022), tudo isso com a finalidade de formar um espermatozoide maduro com motilidade progressiva (CHEN et al, 2022).

O epidídimo é revestido por um epitélio pseudoestratificado colunar com estereocílios, que formam uma rede de comunicação. Cada tipo de célula regula e estabelece um ambiente luminal exclusivo para cada região, para concentração, maturação e armazenamento de espermatozoides (SHUM et al, 2011). Estão presentes células “narrow” no segmento inicial da cabeça do epidídimo (roedores) (BRETON et al, 2016), células basais nas três regiões do epidídimo emitindo projeções intercelulares para o lúmen, células principais responsáveis por mediar a secreção de bicarbonato e ATP, a qual mantém uma interação com as células claras, presentes na região distal do epidídimo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2023). O produto de secreção das células claras é mediado pelo complexo V-ATPase, que lhe permite acidificar o ambiente ocasionando um estado inativo dos canais específicos de passagem de Ca^{++} e K^{+} durante o armazenamento de espermatozoides na região caudal (BRETON et al, 2013).

Outra característica do epitélio epididimário é a capacidade de secreção (apócrina) de biomoléculas complexas ou vesículas extracelulares (VEs) que interagem com os espermatozoides durante a passagem pelo ducto epididimário (DACHEUX et al., 2003; CHEN et al., 2022), também conhecidos como epididimossomos. Os epididimossomos ou VEs são corpos biológicos envoltos por uma bicamada lipídica e proteínas transmembranais, desprovidos de um núcleo e de maquinaria de transcrição (NILENDU et al., 2021) e contêm moléculas de origem epitelial: fosfolipídios, proteínas, sncRNAs e outros metabólitos (RODE et al., 2021; BARRACHINA et al., 2022). Devido à sua capacidade de atravessar barreiras biológicas, eles conseguem verter seu conteúdo na célula-alvo (ZHANG et al., 2020). Isso gera modulações biológicas, na maturação pós-testicular dos espermatozoides (XING et al., 2021), remoção de

espermatozoides anormais, alteração de sncRNA, transferências de proteínas moduladoras da fertilidade e modificação epigenética (NILENDU et al., 2021).

Entre os conteúdos dos espermatozoides estão os miRNAs, os quais são RNAs não codificantes de fita simples e altamente conservado entre as espécies (DE SOUSA et al., 2019; SHI et al., 2021), compostos por 17-25 nucleotídeos, considerados reguladores da transcrição gênica, inibindo a função e facilitando a degradação do mRNA alvo, mediante a ligação da região 3' não traduzida (UTR) de um RNA mensageiro (mRNA) (COOPER, 2019; HALARI et al., 2022). Um único miRNA pode atingir centenas de mRNAs, regulando assim redes inteiras de proteínas (SHI et al., 2021). Os miRNAs desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento embrionário, e em alguns tecidos diferenciados a desregulação nos miRNAs pode levar a formação de células cancerígenas (YING; CHANG; LIN, 2018).

Um perfil dinâmico de sncRNAs e miRNAs é evidente nas VEs-epididimárias, e a função dos miRNAs é mais ampla do que se conhecia até o momento (SELLEM et al., 2021), sendo que, o epigenoma espermático (miRNAs) influencia o início da embriogênese (PASQUARIELLO et al., 2024) e qualidade espermática (XUNWEI; XIAOMEI; QIAN, 2022). Estudos realizados anteriormente no Laboratório de Biologia Celular da UFU, por meio de seqRNA de espermatozoides, obtiveram resultados que mostram uma correlação positiva significativa do bta-miR-425-5p com a taxa de formação de blastocistos (tese de mestrado) (DE SOUZA, 2019), indicando que a presença deste miRNA favorece o desenvolvimento embrionário. Há abundante literatura que fornece evidência do carácter regulador de proliferação celular deste miRNA, e por isso, é considerado um potencial biomarcador em alguns tipos de doenças: câncer de próstata (RODE et al., 2021), câncer de pâncreas (LU; WU; WANG, 2019); carcinoma de células renais (QUAN et al., 2018), no câncer do colo retal é um regulador da quimiorresistência (ZHANG et al., 2016) também, é um potencial terapêutico no câncer de ovário (WU, 2021), em doença neurodegenerativos. No caso do Alzheimer, é sugerido como um alvo terapêutico, pela indução do apoptose celular (YUAN et al., 2020). De acordo com a literatura mencionada, baseado no papel do câncer de miR-425-5p, podemos fazer uma analogia entre as células cancerígenas e o desenvolvimento embrionário, devido às marcadas proliferações celulares na fase de mórula e blastocisto, sugerindo um envolvimento deste miRNA no desenvolvimento embrionário.

A informação como bta-miR-425-5p se relaciona com o desenvolvimento embrionário é limitada até o momento. A única fonte disponível sobre essa questão foi gerada por de Souza

(2019). No entanto, é conhecida a presença deste miRNA nos espermatozoides e nas vesículas extracelulares (VEs) do sêmen ejaculado em bovinos, bem como em baixa proporção nos ovócitos (ALVES et al., 2021).

Portanto, de forma geral, os miRNAs tem papéis importantes no desenvolvimento do embrião, sendo que o bta-miR-425-5p favorece o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*. Este miRNA é conhecido pela função cancerígena mencionado acima, o que é bastante compatível com seu efeito no desenvolvimento embrionário, visto que tanto o desenvolvimento de câncer como o desenvolvimento embrionário inicial são marcados pela intensa proliferação celular. Não se sabe exatamente como este miRNA atua no desenvolvimento embrionário. Por isso, é importante conhecer a origem desse miRNA e seu funcionamento. Assim, fica evidente que esclarecer a origem do miR-425-5p espermático e os processos moleculares de sua ação no desenvolvimento embrionário inicial, poderá contribuir na identificação de alguns problemas de fertilidade de touros e seus possíveis tratamentos, bem como, servir de base para adequações no processo de produção *in vitro* de embriões bovino, ampliando a eficiência desta biotécnica. Também é pertinente lembrar que a produção *in vitro* de embriões bovinos é um excelente modelo biológico para ser extrapolado para outras espécies, incluindo o humano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Origem e Desenvolvimento dos espermatozoides

Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos, onde acontece o processo de “espermatogênese”, eles são revestidos por um epitélio germinativo compostos de duas populações diferentes de células: células somáticas de Sertoli e células espermatogênicas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides), as quais estão envolvidas por uma lâmina basal e por células mioides e revestidas por uma bainha de tecido conjuntivo (KIERSZENBAUM; TRES, 2016) (Figura 1).

A produção de espermatozoides é chamada espermatogênese, um processo que inclui divisão celular por mitose e meiose e é seguida pela diferenciação final das células em espermatozoides. O processo começa com as espermatogônias situadas sobre a lâmina basal e abaixo das zônulas de oclusão entre as células de Sertoli, e estão em constante divisão celular tornando-se em espermatogônias de tipo A e B que ao final de sucessivas divisões mitóticas originam espermatócitos primários com a quantidade de 2N de DNA (dois cromossomos de cada tipo), mas que já se encontra em meiose. Em um estado mais prolongado, o espermatócito primário vai ser submetido a uma primeira divisão meiótica onde os cromossomas homólogos se separam, resultando dessa divisão duas células menores chamados agora espermatócitos secundários (1N). Estas últimas células entram numa segunda divisão meiótica, onde ocorre a separação das cromátides e as células filhas serão agora as espermátides, contendo apenas um conjunto de cromossomos e a metade da quantidade regular de DNA (BANKS, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

A mudança de espermátides para espermatozoide é denominada de espermatogênese, que compreende três etapas: A) etapa do complexo de Golgi: onde se formará a vesícula acrossômica e a localização e posicionamento perpendicular dos centríolos. B) etapa do acrossomo: a vesícula acrossômica se estende tornando-se no capuz acrossômico e logo no acrossomo, o qual contém várias enzimas hidrolíticas, como a hialuronidase, neuraminidase, acrosina e fosfatase ácida, mas também acontece a formação do flagelo a partir dos centríolos, posicionamento das mitocôndrias, o núcleo se torna mais alongado e condensado. C) etapa de maturação: aqui há a perda de citoplasma das espermátides, sendo desprendidos e formando os corpos residuais, que são fagocitados pelas células de Sertoli e, os espermatozoides são liberados para o lúmen do túbulo seminífero (BANKS, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

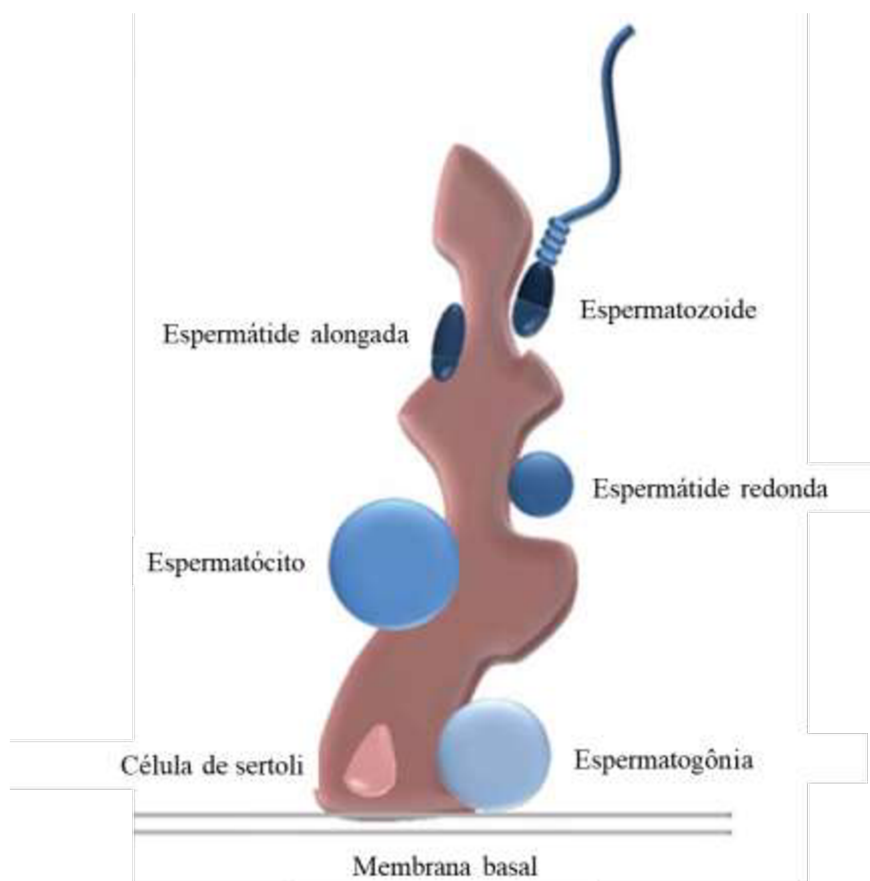


Figura 1. Espermatogênese. Modelo de organização das células do túbulo seminífero (adaptado de MCIVER et al., 2012).

2.2. Maturação dos espermatozoides

Após da saída dos espermatozoides do testículo, eles são direcionados com destino para o epidídimo, embora precisem atravessar o túbulo reto, a rede testicular do mediastino e ductos eferentes. Nesse trajeto os diferentes túbulos estarão revestidos de epitélios simples com modificações e suas células começam gradualmente a aumentar altura. Portanto os espermatozoides atravessaram o epitélio dos túbulos retos que é conformado por células de Sertoli cuja função geral serve como válvula para expulsar os espermatozoides para a rede testicular revestido de um epitélio simples cuboidal. Continuando seu trajeto os espermatozoides são levados para os dutos eferentes, revestidos de células epiteliais colunares, algumas ciliadas e células cuboides (epitélio pseudoestratificado), e finalmente os espermatozoides são lançados para o ducto epididimário, onde acontecerão modulações estruturais e no conteúdo dos espermatozoides (BANKS, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

2.2.1. Composição celular do epidídimo: cabeça, corpo, cauda

O epidídimo é formado por um túbulo longo que se encontra enovelado e segmentado em regiões morfológicas que são funcionalmente distintas, conhecidas como: cabeça, corpo e cauda (Figura 2). Além disso, quatro tipos de células revestem o epitélio do epidídimo: células “narrow”, claras, principais e basais, embora cada tipo de célula contribui para o estabelecimento e regulação de um ambiente luminal único para a concentração, maturação, armazenamento e viabilidade dos espermatozoides. As células principais e basais estão presentes em todas as regiões do epidídimo, as células “narrow” estão localizadas exclusivamente no segmento inicial e as células claras estão presentes na cabeça, no corpo e na cauda do epidídimo, (SULLIVAN, 2016).

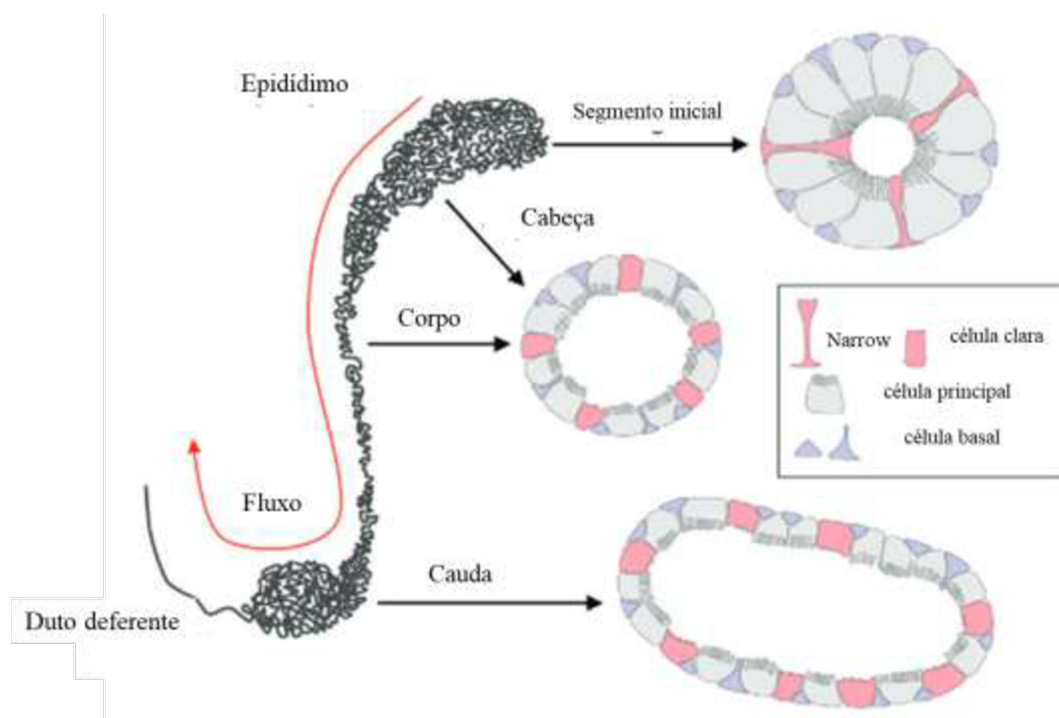


Figura 2. Vista esquemática do epidídimo. O epitélio que reveste o epidídimo é composto por vários tipos de células, incluindo células “narrow”, claras, principais e basais (adaptado de SHUM et al., 2009).

Seguem detalhes sobre esses tipos celulares:

- a. Células basais: estão diretamente em contato com a membrana basal, mantém a integridade estrutural da barreira sangue-epidídimo e foi proposto que elas podem ser células-tronco adultas para o epitélio do epidídimo (PINEL; MANDON; CYR, 2019).

Elas emitem exopodium ou prolongações estreitas que se movem entre as células epiteliais em direção ao lúmen. Essa motilidade dinâmica pode estar relacionado com a sofisticada comunicação entre células epiteliais, conferindo-lhe a característica de plasticidade estrutural dinâmica (ROY et al., 2016). As células basais exibem alto nível de expressão de vários genes envolvidos no tráfego de membrana e metabolismo lipídico (Cd9, Sdc1, Sdc4, Vmp1, Apoe, Apoc1, Sgms2), sugerindo que as células basais podem exibir remodelação de membrana mais dinâmica, ou produção de vesículas (RINALDI et al., 2020).

- b. Células claras (CC): As CCs estão localizadas ao longo do epidídimo, onde regulam e mantem o equilíbrio ácido-base ajustando a secreção de prótons através de uma enzima V-ATPase bombeadora de prótons, localizada em sua membrana apical (BATTISTONE et al., 2024). O papel crucial das CCs é a acidificação luminal (BRETON et al., 2016), mas também expressam altos níveis de genes envolvidos na produção de energia metabólica, presumivelmente para fornecer os altos níveis de ATP necessários para a acidificação do lúmen do epidídimo (RINALDI et al., 2020). Expressam genes de tráfego de membrana (Dab2, Ap1s3, Arf3, Stx7, Cdc42se2), isso é consistente com o importante papel da reciclagem/endocitose da membrana ativa na localização da ATPase vacuolar (BRETON et al., 2013).

Foi demonstrado a existência de três “subclusters” de células claras, devido à expressão de grupos de genes, particularmente o gene marcador de destaque *lapp* que codifica para o polipeptídeo Amilyn. Referente a este gene, a distribuição dos “subclusters” de células claras no epidídimo é diferenciada; dois “subclusters” localizadas no cabeça e corpo do epidídimo expressam o gene *lapp* e o “subcluster” da cauda do epidídimo não expressa, de modo que as funcionalidades de células claras podem ser diferentes entre os “subclusters” (RINALDI et al., 2020).

Estudos mais recentes demonstram que CCs transferem proteínas SLC27A2, EDDM3B, KRT19 e WFDC8 para os espermatozoides durante o trânsito epididimal humano e no camundongo (BARRACHINA et al., 2022).

- c. Células principais: São as principais responsáveis da secreção de vesículas extracelulares e de manter o equilíbrio ácido-base mediante a secreção de bicarbonato dependente de CFTR (do inglês cystic fibrosis transmembrane regulator: um gene que codifica uma proteína que transporta ions cloro e bicarbonato entre as membranas das

células) e caracterizam-se pela sua excepcional capacidade de síntese e secreção de proteínas. Também expressam NHE3 encontrado em alta expressão na membrana apical das células principais, o qual medeia a secreção de prótons, mecanismo mediado por V-ATPase e NHE3, os quais participam na recuperação do pH alcalino do lúmen (PARK et al., 2017). Além disso, foi comprovado a função de regulação da homeostase do Ca^{+2} no lúmen epididimal, mediante os canais TRPV6 e TMEM16A localizados na membrana apical das células principais (GAO et al., 2016).

2.2.2. Eventos morfológicos e moleculares nos espermatozoides durante a maturação

a. Migração da gota citoplasmática:

A gota citoplasmática é o remanescente do citoplasma das células germinativas proveniente da espermatogênese (COOPER, 2019). A existência delas já foi demonstrada mediante a microscopia eletrônica de hélio de alta resolução, quando foi visualizada uma interação do epitélio circundante com estruturas semelhantes a vesículas extracelulares, na região onde se encontra a gota citoplasmática do espermatozoide (PĂUNESCU et al., 2014). Anteriormente também foi descrito e proposto por Hermo, Dworkin e Oko (1988) o processo de mudança e a posição da gota citoplasmáticas durante a transição no epidídimo, qual coincide com a maturação dos espermatozoides. Nos testículos e ductos eferentes, a gota citoplasmática circunda a região da peça intermediária do flagelo, enquanto da cabeça do epidídimo a gota aparece próxima à junção da parte média da peça principal do flagelo; logo a gota apresenta deslocamento lateral no corpo do epidídimo. Na cauda epididimal a maioria dos espermatozoides é desprovida destas gotículas, e o conteúdo das gotas é liberado no lúmen, sendo endocitado seletivamente pelas células claras (HERMO; DWORKIN; OKO, 1988). A formação anormal da gota citoplasmática, a falta ou formação ectópica, pode ser um marcador indicativo de espermiogênese defeituosa (XU et al., 2013). Outros estudos apresentaram evidências de que os espermatozoides da cauda do epidídimo de camundongos portadores da gota citoplasmática foram mais móveis do que aqueles sem a gotícula, sugerindo que a gota citoplasmática representa um dispositivo temporário exclusivamente para a maturação epididimal dos espermatozoides, fornecendo a energia necessária (YUAN et al., 2013).

b. Mudanças no proteoma espermático:

Durante o trânsito epididimal, os espermatozoides sofrem alterações em seu conteúdo de proteínas, lipídios e açúcares. Considerando que os espermatozoides são tradicionalmente inativos em termos de tradução do RNA mensageiro, acredita-se que as proteínas que neles aparecem como consequência de sua maturação no epidídimo sejam sintetizadas pelo epitélio epididimal e então incorporado aos espermatozoides (GERVASI; VISCONTI, 2017). O proteoma do espermatozoide sofre substanciais mudanças durante o trânsito epididimal, provavelmente causado pela diferença de sínteses de proteínas no epitélio nas diferentes regiões do epidídimo (SKERGET et al., 2015). Mediante a análise por espectrometria de massa e análise de GO (do inglês: Gene Ontology), foi encontrado que as proteínas localizadas na cabeça e no corpo do epidídimo podem estar envolvidas na remodelação e na localização das proteínas espermáticas adicionadas durante o trânsito pelo epidídimo (SKERGET et al., 2015). As proteínas associadas com processos biológicos no espermatozoide diminuem durante o trânsito epididimário especificamente do corpo para cauda, e proteínas associadas com os componentes celulares ou aderidos ao flagelo do espermatozoide estão em incremento desde a cabeça até a cauda (SKERGET et al., 2015). O mecanismo de aquisição das proteínas nos espermatozoides não está ainda totalmente esclarecido, mas as pesquisas sinalizam possíveis mecanismos biológicos de agregação. Um dos principais fenômenos na maturação pós-testicular dos espermatozoides é representado por vários tipos de vesículas lipídicas secretadas pelo epitélio do epidídimo e que interagem com os gametas, conhecidas como epididimossomos ou vesículas extracelulares. Elas contêm diferentes padrões biológicos tipo proteico e particular composição de reconhecimento lipídico (SULLIVAN; SAEZ, 2013). Imagens de alta resolução também revelaram conexões estreitas entre o espermatozoide e a superfície epitelial do epidídimo apical sugerindo algum possível mecanismo de comunicação celular (PĂUNESCU et al., 2014). Mas as vesículas extracelulares tornaram-se de interesse para muitas pesquisas, por sua importância na comunicação celular. Recentemente foi demonstrado que as vesículas extracelulares participam na transferência de proteínas desde o epidídimo para o espermatozoide durante a maturação pós-testicular (BARRACHINA et al., 2022). Recapitulando sobre o anteriormente mencionado, a composição de proteínas nas regiões do epidídimo é dinâmica e variável e um dos possíveis veículos de entrega de proteínas para o espermatozoide são as vesículas extracelulares.

c. Mudanças na superfície espermática

Outras mudanças que acontecem durante a passagem pelo epidídimo dos espermatozoides, são as alterações moleculares na superfície da membrana. Essas alterações incluem adição, remoção

e/ou modificação de açúcares e lipídios externos da membrana plasmática do espermatozoide (GERVASI; VISCONTI, 2017). Glicoproteínas e polissacarídeos formam uma interface entre o espermatozoide e seu ambiente externo (conhecidos como glicocálice), e as atividades das glicosidases e glicosil transferases que são secretadas no lúmen do epidídimo modifica os glicanos (polissacarídeos estruturais) dos espermatozoides que foram produzidos nos testículos (TECLE; GAGNEUX, 2015).

d. Aquisição de motilidade nos espermatozoides

Após a espermição, os espermatozoides atravessam um conjunto de túbulos para logo ser levados para o segmento inicial ou cabeça do epidídimo no caso de bovinos. Os espermatozoides que são transportados para a cabeça do epidídimo são imóveis e logo vão para o corpo e finalmente, para a cauda do epidídimo, onde são armazenados aguardando a ejaculação. À medida que os espermatozoides transitam pelo epidídimo e depois residem na cauda do epidídimo, eles ganham a capacidade de se tornarem progressivamente móveis e adquirem função acrossômica (VADNAIS et al., 2013). Um dos requisitos para a motilidade dos espermatozoides é a disponibilidade de energia na forma de ATP utilizado pelas dineína ATPases axonemais dentro do flagelo (PIOMBONI et al., 2012). Foi demonstrado que ausência do gene *CCDC28A* afeta a motilidade, morfologia e por tanto a fertilidade nos camundongos (ZHOU et al., 2024). A motilidade do espermatozoide é dependente dos níveis de cAMP intracelular e da fosforilação de proteínas, para ativação gradual da motilidade durante o trânsito epididimal. As concentrações de bicarbonato e Ca^{2+} são dois componentes importantes do fluido luminal do epidídimo que poderiam controlar diretamente as concentrações intracelulares de cAMP nos espermatozoides do epidídimo e, conseqüentemente, ativar fosforilações e desfosforilações dos braços de dineína, provocando assim a aquisição da motilidade progressiva nos espermatozoides na cauda epididimal. Estes dados são correlacionados com o incremento das concentrações de cAMP nas regiões distais do epidídimo (DACHEUX; DACHEUX, 2014).

2.2.3. Interação do espermatozoide e epitélio no processo de maturação

O compartimento intraluminal do epidídimo contém macromoléculas provenientes do epitélio, que interagem com a superfície do espermatozoide, modulando a capacidade de fertilização do espermatozoide e a motilidade direta (DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003). Esta interação pode estar relacionada com as vesículas extracelulares, e esta interação já foi demonstrada há muitos anos que existência de interação vesícula extracelular e espermatozoide

(YANAGIMACHI et al., 1985), as quais são principalmente originadas de células principais (BARRACHINA et al., 2022).

As vesículas extracelulares (VEs) ou conhecidos como epidídimossomos são moléculas delimitados por uma bicamada lipídica que podem conter proteínas, biomoléculas de membrana, lipídios, metabólitos e ácidos nucleicos. Têm aparência esférica com diâmetros variando de 50 a 250 nm. Moléculas na superfície dos VEs promovem a interação com outras células por meio do reconhecimento molecular com lipídios e ligantes na superfície da célula receptora. Estas interações atrativas e específicas podem induzir a adesão, fusão e até internalização do VE com a membrana plasmática da célula receptora (SULLIVAN, 2016). Esta adesão é devido a proteínas transmembranas conhecidas como tetraspaninas, que são altamente abundantes na superfície das VEs. As tetraspaninas como CD63, CD9 e CD81 são marcadores bem estabelecidos de VEs (MULCAHY; PINK; CARTER, 2014; ZHOU et al., 2018).

O processo de biogêneses de vesículas extracelulares é escassamente esclarecido, mas se sabe que elas vêm de uma origem endosomal. Inicialmente, há uma formação de endossomos no interior da célula, mediante brotamentos da membrana plasmática da célula e são caracterizados pelo acúmulo de vesículas intraluminais (ILVs). As células utilizam a via de formação dos ILVs para degradar, reciclar ou liberar mediante exocitose diferentes tipos de biomoléculas. Os primeiros ILVs, passam por processos de maturação e se tornam endossomas tardios ou corpos multivesiculares- MVBs. E as moléculas bioativas são direcionadas aos MVBs, através da via dependente dos complexos de classificação endossômica (ESCRT) ou independente de ESCRT. Após disso, as MVBs podem ter diferentes destinos: são direcionados para os lisossomos para degradação ou fundem-se com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo para o meio extracelular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; JIN et al., 2022).

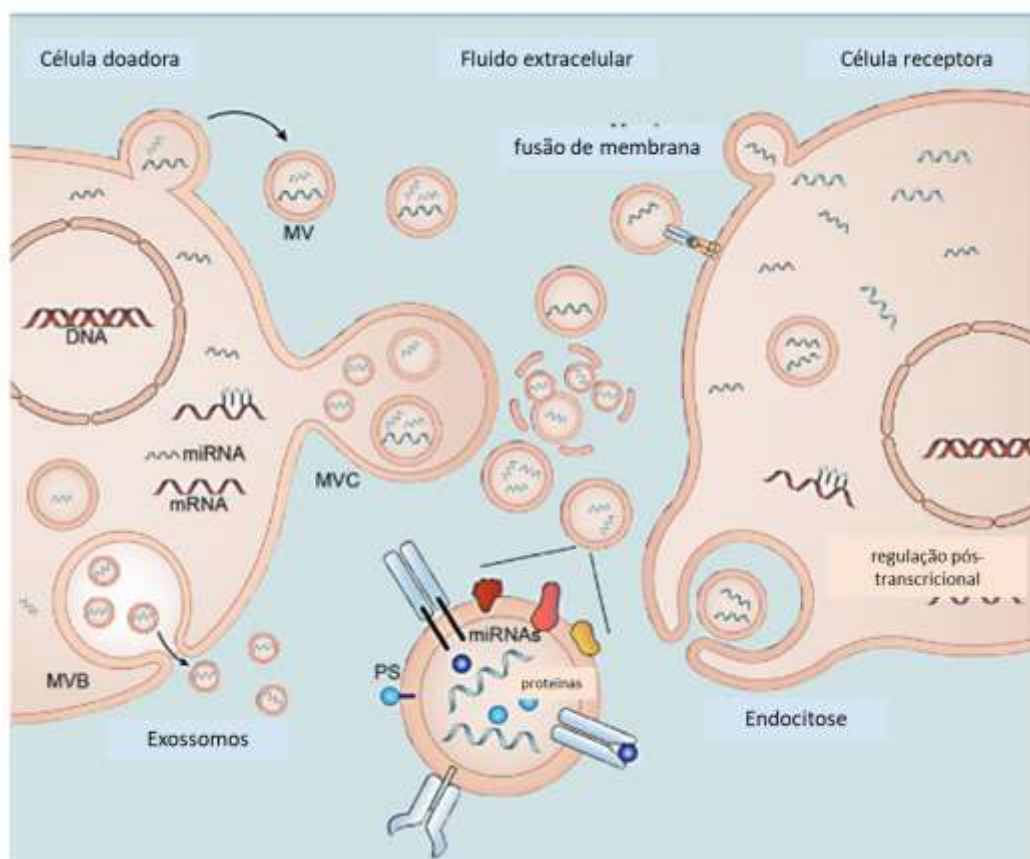


Figura 3. Representação da biogênese das vesículas extracelulares (VEs) e processos de comunicação com a célula alvo. Os miRNAs secretados são transportados por vesículas extracelulares (VEs) e transferidos para as células receptoras, onde regulam a expressão gênica pós-transcricional (adaptado de BELLEANNÉE, 2015).

Microvesículas (MVs) são liberadas da membrana plasmática por meio de brotamento externo. A corpo multivesicular (MVC) é liberada pela brotação da membrana durante a secreção apócrina. Vesículas extracelulares e sua carga de miRNA são transferidas para células receptoras após endocitose ou fusão de membranas. Outros tipos de biomoléculas também podem ser encapsulados nestas estruturas ou nas gotas lipídicas. O conteúdo dessas estruturas pode incluir proteínas, lipídios, snRNAs e principalmente dada a sua função na regulação transcricional miRNAs. O estudo dessas moléculas é particularmente de interesse, pois elas possuem papéis essenciais na fertilidade, na capacitação do espermatozoide e na transmissão de sinais epigenéticos (SELLEM et al., 2020) (Figura 3).

A interação entre vesículas extracelulares e espermatozoides ainda não está bem esclarecida, mas se sabe que pode existir uma interação ligante receptor, e que esta interação pode ser mediada pela via GPI para a ancoragem de proteínas na superfície do espermatozoide, com

possíveis proteínas tetraspazinas como CD9 ou outras, que podem ser candidatas à regulação da fusão das membranas. Mas, outros candidatos envolvidos neste processo são as “rafts lipídicas altamente enriquecidas em colesterol e esfingolipídios. Esses microdomínios também compartimentam proteínas como P25b e SPAM1, as quais são consideradas os responsáveis da ancoragem entre vesículas extracelulares e espermatozoide. Outra via de adesão do epidídimosoma pode ser seguida pela criação de um poro de fusão transitório no espermatozoide, modelo que poderia potencialmente facilitar a troca bidirecional de proteínas e outras macromoléculas dentro e fora da célula espermática em maturação; subsequentemente acontece a liberação do conteúdo do epidídimosoma para espermatozoide mediante aquele poro de fusão (GRIFFITHS et al., 2008; HARROUN; KATSARAS; WASSALL, 2008; ZHOU et al., 2018).

2.3. miRNAs nos espermatozoides

Existem muitos estudos que abordam a importância do estudo de miRNAs nos espermatozoides, mas um importante trabalho acerca da biologia do órgão epididimal relaciona o processo de amadurecimento do espermatozoide com relação à expressão de miRNAs, demonstrando o incremento gradualmente dos miRNAs desde o parênquima testicular até a cauda epididimal, coincidindo com o aumento de miRNA nos espermatozoides ejaculados (SELLEM et al., 2021). Também os miRNAs são de interesse já que podem ser considerados marcadores específicos para alguma funcionalidade do espermatozoide, tais como durante a criopreservação (XU et al., 2021), marcadores para concentração espermática (RADTKE, 2019), ou processos biológicos que afetam a morfologia espermática, motilidade e a espermatogênese em suínos (CURRY; SAFRANSKI; PRATT, 2011), e gansos (WU et al., 2023). A função dos miRNAs nos espermatozoides é provavelmente mais ampla do que se sabe no momento. Outra função dos miRNAs é que estão envolvidos em processos biológicos futuros e epigenéticos, que serão abordados nos tópicos seguintes.

2.3.1. Biologia de miRNAs

Os microRNAs são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) não codificantes, com tamanho variando entre 17 e 25 nucleotídeos. Eles regulam a expressão dos genes após a transcrição, modificando o padrão de tradução de proteínas por meio da interação com os RNAs mensageiros (mRNAs). A produção de miRNAs é um processo complexo que começa no núcleo e termina no citoplasma. Este processo envolve várias enzimas e complexos proteicos

celulares que regulam cada etapa até a geração dos miRNAs maduros, os quais são capazes de exercer suas funções. A via de produção de miRNAs mais estudada é a canônica.

A biogênese canônica dos miRNAs inicia com a transcrição do DNA. Esses miRNAs podem ser codificados em regiões intragênicas (principalmente intrônicas) e intergênicas, podendo estar presentes tanto na fita “sense” quanto na fita “antisense” do DNA. Normalmente, a transcrição é conduzida pela RNA polimerase II ou pela RNA polimerase III. O primeiro transcrito pri-miRNA, tem uma estrutura de “hairpin”, existindo uma parte na qual a molécula está pareada formando uma região de dsRNA (RNA de cadeia dupla) e com seus extremos protegidos por CAP (capped) e cauda poli-A. O pri-miRNA é processado no núcleo pelo complexo enzimático formado pela RNase III Drosha e a proteína Pasha ou DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein (DGCR8), que tem capacidade de se ligar nessa molécula de RNA de cadeia dupla e remover a cauda de poli A e o encapsamento dos extremos da mesma. Esse processamento resulta em uma molécula de RNA de dupla fita com aproximadamente 70 nucleotídeos, denominada miRNA precursor ou pré-miRNA, que é exportada para o citoplasma com o auxílio das proteínas exportina-5 e Ran-GTP. No citoplasma, a enzima Dicer continua com o processamento do miRNA, removendo a alça não pareada da molécula e dando origem a um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Alternativamente, a proteína argonauta 2 (Ago2) pode participar da clivagem do pré-miRNA no citoplasma. Esse miRNA de fita dupla é associado a um complexo proteico chamado complexo silenciador induzido por RNA (RISC), formado por diversas proteínas, sendo as proteínas Ago um dos fatores mais importantes, e são as responsáveis pela interação com as moléculas de RNAs. O RISC causa a separação das duas fitas do miRNA, e, geralmente, uma delas é degradada, enquanto a outra, que corresponde ao miRNA maduro, fica exposta para poder parear com o mRNA-alvo (LIMA et al., 2021; SHANG; SENAVIRATHNE; LAI, 2023; BOFILL-DE ROS; VANG ØROM, 2024).

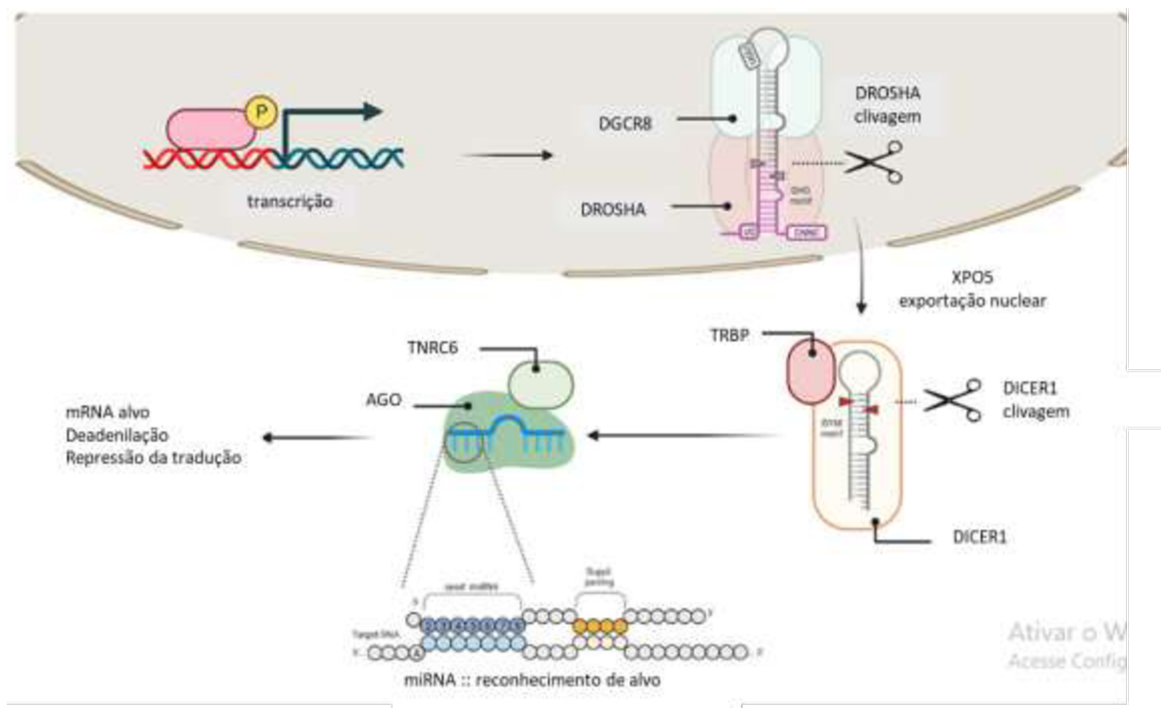


Figura 4. Biogêneses de miRNAs, via canônica (adaptado de BOFILL-DE ROS; VANG ØROM, 2024)

Um miRNA pode controlar a expressão de mais de um mRNA alvo ou um mRNA pode ser regulado por multiplex miRNAs. As regiões 5' de miRNAs geralmente contribuem com a especificidade e atividade na união com mRNA alvo. A interação entre miRNA e mRNA é restrita para uma sequência conservada chamada “seed” que está localizada perto da região 5' do miRNA com aproximadamente 5 - 8 nucleotídeos. Os miRNAs controlam a expressão dos mRNAs mediante a ligação com a região 5' UTR ou 3' UTR do alvo, provavelmente essa interação seja feita por energia de hibridização e sequências complementares (CAI et al., 2009) (Figura 4).

2.3.2. miRNA do epitélio seminífero e epididimário

Os miRNAs desempenham um papel essencial na regulação da espermatogênese e na maturação dos espermatozoides. Portanto, mudanças nos níveis e padrões de expressão dos miRNAs podem resultar em anomalias reprodutivas (MCIVER et al., 2012). Entretanto compreender a função biológica dos miRNAs desde o testículo até o epidídimo continua sendo de grande interesse atual. Foi demonstrado que os miRNAs expressos nos túbulos seminíferos não diferem em cachorros jovens e velhos, ao contrário do que ocorre no epidídimo (KIM et al., 2023). Mas existem miRNAs responsáveis pela proliferação das SSC (do inglês spermatogonial

stem cells) no testículo, e regulação da meiose por meio do miR-100, a família miR-29 e, miR-34c (HUANG et al., 2017). Entretanto quando se trata do ambiente luminal do epidídimo nos referimos a uma complexidade; o ducto epididimário é definido pelas células que compõem seu epitélio, e devido à heterogênea distribuição das células, compreender os processos de regulação espermática mediados pelos miRNAs e outras biomoléculas continua sendo um questionamento. O epidídimo expressa e compartilha miRNAs em suas três regiões, tanto em células cultivadas *in-vitro* e tecido (BROWNE et al., 2018). Particularmente, foi observado que apresenta um padrão de expressão heterogêneo de miRNAs comparando as diferentes regiões (cabeça - corpo, corpo). Existe uma “upregulation” ou mais expressão de miRNAs em regiões posteriores e “downregulation” ou menor expressão de miRNAs em regiões anteriores do epidídimo, de tal modo que a expressão encontrada de genes alvos dos miRNAs é diferente para cada região do epidídimo em Cattleyak (CY) um híbrido de bovino e Yak (ZHAO et al., 2021).

2.3.3. miRNA nas Vesículas extracelulares (VEs)

Sabe-se que as vesículas extracelulares estão presentes no fluido testicular e do epidídimo, e que são responsáveis pela comunicação celular; então é preciso que a interação entre vesícula tenha um vínculo específico. Nas células do testículo como as espermatogônias, células de Sertoli, espermatozoides são altamente eficientes para captar vesículas extracelulares de origem testicular (CHOY et al., 2022). Além de isso vários papéis biológicos foram propostos para as vesículas extracelulares do epidídimo, incluindo modulação da motilidade espermática durante o trânsito epididimal, proteção contra estresse oxidativo, agregação de proteínas de superfície essenciais para a fertilização e epididimossomos marcadores de espermatozoides defeituosos para eliminação (SULLIVAN; SAEZ, 2013). Ainda, as vesículas extracelulares levam miRNAs e outras biomoléculas para a célula alvo, mas de acordo com a região da origem podem carrear diferentes tipos de miRNAs, no caso do epidídimo. Por exemplo as vesículas extracelulares provenientes da cabeça e cauda epididimal, apresentam diferentes perfis de miRNAs (BELLEANNÉE et al., 2013).

2.3.4. miRNA nos espermatozoides durante o trajeto do túbulo seminífero e ducto epididimário

Os perfis de sncRNA são modificados dinamicamente à medida que os espermatozoides transitam através do epidídimo, devido à combinação de múltiplos fatores, como perda da góticula citoplasmática, degradação intracelular e interação com epididimossomos. Além disso,

a expressão de sncRNA também está influenciado pela idade do animal (WU et al., 2020). O comportamento de sncRNAs nos espermatozoides, desde sua formação até o ejaculado, é considerado um evento dinâmico e complexo de compreender. Foi descrito que a “expressão” de piRNA, miRNA e tRNA nos espermatozoides tem uma tendência geral descendente ou ascendente desde o testículo até a região distal do epidídimo. Particularmente o miRNA representa apenas o 1% da expressão de sncRNA nos espermatozoides do parênquima testicular, e a expressão de miRNA nos espermatozoides ao longo do epidídimo vai aumentando (5%, 13% e 27% em cabeça, corpo e cauda, respectivamente) para atingir 38% nos espermatozoides ejaculados. O parênquima testicular e a cabeça do epidídimo, bem como a cauda do epidídimo e o esperma ejaculado, estão próximos em expressão de miRNAs e independentemente de outros sncRNA. Além disso, espermatozoides provenientes da região do corpo demonstram ter a maior expressão de rsRNAs (46% da expressão de sncRNA) (SELLEM et al., 2021). As expressões dos miRNAs podem ser afetadas por diversos fatores. Nos bovinos púberes a abundância de miRNAs específicos compromete o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento de embriões pré-implantacionais (WU et al., 2020). Além disso a cauda epididimal é conhecido por ser um local de reserva dos espermatozoides (ZHANG et al., 2020), mas também é um local de aquisição de miRNAs envolvidos com o desenvolvimento embrionário que interagem com os espermatozoides; em camundongos, espermatozoides da cauda epididimal expressaram bta-miR-100, um miRNA associado com a iniciação da plnipotência (CONINE et al., 2018). É importante esclarecer que onde se lê expressão de miRNA, está sendo colocado a quantidade de miRNA e não a transcrição. Isso porque, após a compactação da cromatina do espermatozoide que ocorre durante a espermogênese, o DNA espermático perde a capacidade de transcrição e, portanto, qualquer alteração de conteúdo de miRNA deve estar ocorrendo por aquisição miRNAs expressos em outras células (DE SOUZA, 2019)

2.3.5. bta-miR-425-5p

Bta-miR-425-5p é a nomenclatura de um miRNA próprio de bovinos em sua forma madura (miRBase). A sequência miR-425-5p madura é altamente conservada em mamíferos, incluindo suíno, humano e camundongo (CHEN et al., 2017). Esta sequência altamente conservada é envolvida com a proliferação celular “descontrolada”, sendo confirmada a expressão de miR-425-5p em tecido de câncer gástrico e em células em cultura deste tumor (YAN et al., 2017), sendo considerado um marcador potencial neste tipo de câncer (ZHANG et al., 2017). Além disso, pode ser encontrado nos exossomos de metástases óssea e câncer prostático (RODE et

al., 2021), em tecidos metastáticos de câncer pancreático (LU; WU; WANG, 2019). Mediante o silenciamento deste miRNA foi comprovado o efeito de proliferação e invasão do câncer ovariano (WU et al., 2021); da mesma forma, foi demonstrado efeito oncogênico potencializando na proliferação do carcinoma hepatocelular (FANG et al., 2017; WU et al., 2022), e promovendo a progressão do câncer colo retal (LIU et al., 2020). Também já foi descrito que ele é um regulador negativo da proliferação de pré-adipócitos intramuscular (CHEN et al., 2017).

Existe abundante informação que evidencia o papel de proliferação celular do miR-425-5p nos diferentes tipos de câncer em mamíferos e, recentemente, também foi encontrado no fluido folicular, estando envolvido na maturação dos oócitos e no desenvolvimento embrionário (AOKI et al., 2024). Também é localizado nos exosomas de placenta e de células do cúmulo (ZHAO et al., 2019; ANDRADE et al., 2019). Este miRNA foi detectado em vesículas extracelulares, nos epididimossomos das regiões da cabeça e cauda do epidídimo em bovinos, tendo maior expressão do miR-425-5p na região da cauda epidídimal (BELLEANNÉE et al., 2013), e nos espermatozoides ejaculados (DE SOUZA, 2019; ALVES et al., 2021). Em resumo, sabe-se que este miRNA está presente nos espermatozoides ejaculados e tem um efeito positivo na formação de blastocistos. No entanto, estudos focados na origem do bta-miR-425-5p e na sua agregação aos espermatozoides são inexistentes. Portanto, é de interesse investigar esses aspectos para compreender futuros processos biológicos que possam ser aplicáveis às tecnologias reprodutivas, melhorando a produção de embriões bovinos, e também para extrapolar esses conhecimentos a outras espécies, como os humanos.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar e quantificar se o bta-miR-425-5p, encontrado nos espermatozoides de bovinos, é oriundo da espermatogênese ou se é adicionado durante o trânsito epididimário.

3.1. Objetivos específicos

- Investigar a presença do bta-miR-425-5p no epitélio e nas VEs das diferentes regiões do epidídimo e do testículo.
- Identificar o bta-miR-425-5p nos espermatozoides provenientes das regiões epididimárias e testicular.

4. MATERIALES E MÉTODOS

4.1. Obtenção das Amostras Biológicas

As amostras (testículo de bovinos) foram adquiridas de abatedouros localizados na região da cidade de Pirassununga - São Paulo (SP), e transportados em gelo dentro de sacos plásticos para o Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) (CEUA N° 2626040724); ao chegarem no laboratório foram lavados com solução salina fria para a retirada de artefatos.

Um N° total = 22 testículos de bovinos foram adquiridos e distribuídos para as diferentes análises.

4.2. Coleta de fluido epididimário, fluido testicular e tecidos

É importante mencionar para melhor compreensão das metodologias, que todas as amostras foram coletadas a partir das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo e parênquima testicular.

Sobre uma caixa de isopor com gelo foi separado o epidídimo do testículo com ajuda de um bisturi estéril; os cortes foram feitos com precaução para evitar furar o tecido. Em cada epidídimo dissecou-se (separou-se) as regiões de: cabeça, corpo e cauda (trocando os bisturis e luvas por região), as quais foram colocadas separadamente sobre placas de Petri plástica (60x15) com 3 mL de PBS 1X filtrado (0,20 µL). Posteriormente, as regiões ou peças foram recortadas em fragmentos finos e comprimidas delicadamente com a ponta dos dedos, até obter uma mudança de turbidez no PBS, o que indica presença de fluido epididimário e espermatozoides. Logo, foi coletado o fluido epididimário em tubos de 1,5 mL livre de RNA com a codificação correspondente de cada região e depositados em caixa com gelo até seu armazenamento a -80°C.

A obtenção de fluido testicular foi feita pela punção testicular, com uma seringa de 10 mL. Foi injetado no testículo 3mL de PBS 1X e rapidamente foi feito massagens externas sobre o testículo para que o PBS misturasse no interior do órgão. Depois, com a mesma seringa, foi feita novamente a punção para aspiração testicular e extrair aproximadamente 1mL de fluido testicular. O fluido obtido foi coletado em tubos de 1,5 mL livre de RNA e foi agregado 500

μL de PBS para completar 1500 μL . No frasco foi colocado a codificação correspondente do testículo e depositado em caixa com gelo até seu armazenamento a -80°C .

A obtenção dos ductos epididimários das regiões e túbulos seminíferos foi realizada com a ajuda de tesoura e bisturis estéreis. Foi coletado um segmento de aproximadamente 5 mm de espessura dos ductos epididimários de cada região. Sobre uma placa de Petri estéril, os segmentos foram lavados três vezes com PBS 1X e, em seguida, armazenados em tubos de 1,5 mL livres de RNA a -80°C . No caso do testículo, para a coleta dos túbulos seminíferos, foi realizado a partir do parênquima testicular. De forma semelhante, foi cortado um segmento de 5 mm, que foi lavado três vezes com PBS 1X sobre uma placa de Petri estéril e, posteriormente, armazenado em tubo de 1,5 mL livre de RNA a -80°C . Estas amostras foram destinadas para a análise de PCR.

4.2.1. Processamento de fluido epididimário e fluido testicular

O fluido testicular e os fluidos epididimários de cada região foram centrifugados a (600g por 10 min a 4°C) para separar o fluido (sobrenadante) dos espermatozoides (pellet). Do sobrenadante foram isoladas as vesículas extracelulares (VEs) protocolo detalhado abaixo.

4.2.2. Isolamento de Vesículas Extracelulares (VEs)

Foi utilizado o protocolo de isolamento de vesículas extracelulares de ALVES e outros (2021) O sobrenadante foi centrifugado a (4000 g por 20 min 4°C) duas vezes para a retirada de debris e uma centrifugação adicional (16500 g por 30 min 4°C) para obter as vesículas extracelulares grandes; depois da última centrifugação o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior isolamentos das VEs.

Antes de continuar com o isolamento das VEs por ultracentrifugação, é importante salientar que o PBS utilizado estava à temperatura ambiente e três vezes filtrado, e que para todos os processos de filtração mencionados foi utilizado a mesma medida do filtro (0,20 μL).

As amostras (sobrenadante) foram descongeladas sobre gelo e foi filtrado de forma consecutiva 500 μL de PBS 1X, 500 μL de sobrenadante (amostra) e 1500 μL de PBS 1X e colocados em tubos estéreis de ultracentrifugação. Foi então realizada uma ultracentrifugação (120000g por 70 min a 4°C). Depois o sobrenadante foi descartado, e foi agregado 2500 μL de PBS 1X para uma segunda ultracentrifugação nas mesmas condições e novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 70 μL de PBS1X. O volume final foi distribuído da

seguinte forma para posteriores análises, 10 µL destinados para os análises de rastreamento de nanopartícula (NTA) e 60 µL para extração de RNA (armazenados -80°C).

4.3. Caracterização de Vesículas Extracelulares

A caracterização das VEs provenientes de fluido epididimário e fluido testicular foi realizada por meio das análises morfológicas e o número de amostras utilizado por metodologia é mencionado a seguir. Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (N° = 1 par de testículo), a Citometria de fluxo para identificação da presença mediante marcadores de VEs (CD81, Alix e Syntenin) (três pares de testículo), e para a determinação do tamanho e concentração das partículas foi feita por meio de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) (sete pares de testículos), técnicas e parâmetros sugeridos pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) (WELSH et al., 2023).

4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão

O protocolo para o processamento das amostras no microscópio eletrônico de transmissão foi o utilizado pelo Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo e pelo Laboratório de Biologia de Reprodução do ICBIM/Universidade Federal de Uberlândia. Para isso foi feito um pull das VEs isoladas conforme foi descrito anteriormente, para cada porção epididimal e testicular. Para a fixação das amostras, o pellet foi ressuspensão em 200 µL de solução fixadora composta por glutaraldeído a 4%, paraformaldeído a 6,25% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2 - 7,4) e mantido por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS para realizar uma nova ultracentrifugação a 119700g por 70 min a 4 °C, com o objetivo de remover a solução fixadora. Os pellets resultantes da ultracentrifugação foram ressuspensão em 70 µL de PBS e armazenado (3 - 4 °C) até a análise posterior. Antes da observação no microscópio eletrônico, cada amostra foi colocada em uma grade de cobre revestida por FORMIVAR® e mantida por 5 min para a evaporação do excesso de PBS. Em seguida, foi adicionada uma gota de acetato de uranila 2%, durante 3 minutos. O excesso foi removido com papel filtro úmido antes da leitura das amostras no microscópio como é descrito por Luo (2021), logo as VEs foram documentadas fotograficamente no Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL 100 CX II, BioCell) (Hitachi HT 7700, Tokio, Japan).

4.3.2. Análise de rastreamento de nanopartícula (NTA)

Para a análise de rastreamento de nanopartícula, as amostras foram avaliadas de forma individual por região, com os 10 μL destinados para o NTA que foram obtidos do isolamento de VEs de cada região do epidídimo e testículo. Foram utilizadas diluições seriadas com PBS 1X, começando com 10:1000 (diluição 100x). Por serem amostras heterogêneas entre as regiões no conteúdo de VEs, foi feita mais diluições até obter uma visualização adequada (20 - 80 partículas/frame). O critério de análise das amostras foi quanto ao tamanho e concentração das partículas por meio do equipamento NanoSight (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern Panalytical, UK). Foram adquiridos 5 vídeos de 30s para cada amostra, capturados pela câmera sCMOS com configuração de nível 13 e um “threshold” de 5, enquanto a temperatura foi mantida a 38,5 °C.

4.3.3. Citometria de Fluxo

Para a realização da citometria de fluxo, VEs foram isoladas de 500 μL de amostra; após a última centrifugação o pellet foi ressuspensão em 70 μL de PBS 1X conforme foi descrito anteriormente. Logo após, foi feito um pool por região de cada par de testículo. Antes de começar com a incubação dos anticorpos para a citometria de fluxo, foi realizada centrifugação a 20000 g, por 30 min a 4 °C, para a sedimentação de qualquer partícula que pudesse interferir na análise. A amostra de cada região (cabeça, corpo, cauda e testículo) contendo vesículas, foram divididas entre os marcadores positivos e negativo, e foram incubadas com os anticorpos conjugados como é mencionada embaixo.

Primeiramente todos os grupos das amostras de VEs foram preparadas num volume de 20 μL com PBS (1:1 v/v) para ser incubadas com anticorpos. O anticorpo marcador de superfície de VEs foi o anticorpo primário monoclonal de camundongo CD81-PE (Abcam, 81436) (1:20 v/v) incubado por 2 h no agitador. Para a detecção de proteínas intracitoplasmáticas, foi realizada a permeabilização de membrana das VEs utilizando Triton 0,001% (1:1 v/v) por 15 min à temperatura ambiente, logo foi agregado 30 μL PBS para parar a reação. Após a permeabilização se seguiu com as incubações de anticorpos. O segundo anticorpo de VEs foi o anticorpo monoclonal mouse IgG₁ κ conjugado com phycoerythrin Alix-PE 1A12 (Biotechnology, sc-53540 PE) (1:50 v/v) incubado durante 60 min no agitador. Um terceiro anticorpo positivo de VEs foi o anticorpo primário mouse monoclonal IgG_{2a} κ Syntenin-1 (C-3) (Biotechnology, 515538), e após da permeabilização foi adicionado o anticorpo secundário goat anti-mouse Alexa FluorTM 488 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) 100 μL (diluído

1:2000) e incubado por 90 min. Após isso, foi necessário comprovar que as VEs não tinham contaminação celular. Então, espermatozoides e VEs foram submetidos a permeabilização, e foram incubadas com um marcador de mitocôndria, sendo o anticorpo primário mouse monoclonal IgG2a Tom20 (F-10) (Biotechnology, sc-17764) (1:100 v/v) por 60 min, logo foi agregado o anticorpo secundário goat anti-mouse Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) 100 µL (diluído 1:2000 v/v) e incubado por 90 min no agitador.

As amostras foram analisadas com o equipamento de Citometria de Fluxo Cytoflex (Beckman Coulter, USA), equipado com um laser violeta (405 nm), azul (488 nm). O citômetro foi configurado para o detetor “laser violet” para a coleta da dispersão lateral (VSSC). O limite de VSSC foi ajustado de acordo com as recomendações para as beads de tamanho (100 a 300 nm). Para detectar nanopartículas conforme o comprimento de onda do fluoróforo conjugado com o anticorpo, fluorescência do isotiocianato de fluoresceína (FITC) e da ficoeritrina (PE), foram usados os filtros de 525/40 nm e 585/42 nm, respectivamente. O “gate” foi determinado com base no controle negativo de cada anticorpo (PBS+ anticorpo).

4.4. Purificação de Espermatozoides das diferentes regiões e testículo

As suspensões de células obtidas a partir de cada fluido epididimário e testículo foram centrifugadas a 600 g por 10 min a 4°C e o pellet foi tratado para purificação com um tampão de lises de células somáticas obtendo só espermatozoides, como é descrito em baixo.

4.4.1. Lises de Células Somáticas

O pellet foi ressuspenso em 3 mL de tampão de lises 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. As misturas foram então centrifugadas a 1400 g por 10 minutos e o pellet ressuspenso em 3 mL de PBS e novamente centrifugado nas mesmas condições. Nessa etapa foram repetidas mais duas vezes para retirada das células somáticas lisadas e posteriormente foi feita a coloração panótica rápida (LABORCLIN, Brasil) de cada amostra para corroborar ausência de células somáticas após o tratamento com o tampão de lises, e o pellet de espermatozoides foram armazenados a -80°C.

4.5. Extração de RNA de Vesículas Extracelulares, Espermatozoides e Tecido

As extrações de RNA foram feitas da seguinte forma: 750 µL de TRIZOL® LS Reagent (Qiagen Science, Maryland, USA) foram agregados por amostra e logo agitado em vórtex

vigorosamente até o pellet celular sumir. As amostras ficaram em repouso 5 min em temperatura ambiente. Foi adicionado 200 μ L de clorofórmio e misturado com vórtex e novamente em repouso em temperatura ambiente por 3 min. Após, foi realizada uma centrifugação por 12000 g por 15 minutos a 4 °C, a fase aquosa transparente foi transferida para um novo tubo Livre de RNAsa e adicionado 1,33 μ L de glycoblu (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Lituania) e misturado bem; logo foi acrescentado 500 μ L de isopropanol, misturado e estocado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20 °C por 30 min. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 20000 g por 30 min a 4 °C, e então foi removido o sobrenadante e lavado o pellet com 1 mL de álcool 75% preparado na hora, seguido de uma centrifugação a 12000 g por 5 min a 4°C. Este último processo foi repetido, duas vezes. Foi retirado o álcool e o pellet ressuspendido em 10 μ L de água ultrapura livre de RNase. E finalmente as qualidades das extrações de RNA das amostras foram mensuradas no NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA); foi considerado a quantidade de RNA total em um ng/ μ L com relação de 260/280 da absorbância.

4.6. Detecção de miR-425-5p em vesículas extracelulares, espermatozoides e tecido das diferentes regiões de epidídimo e testículo

Após da extração de RNAs totais todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA), sendo considerada uma ou meia reação de DNase de acordo com a rendimentos de RNA totais de cada amostra. A relação de DNase utilizado foi considerado de acordo com as indicações do protocolo do fabricante, ou seja, uma reação de DNase trata 1000 ng de RNA. Seguidamente foi realizada a sínteses do cDNA mediante o uso do kit Norgen (NORGEN BIOTEK CORP, Canada); seguiu-se o protocolo estabelecido pelo fabricante para a sínteses de cDNA. A sínteses de cDNA foi feita a partir de 200 ng de RNAs por amostra, logo foram adicionados 5 μ L de 2x Reaction Mix; 0,5 μ L de microScript microRNA Enzyme Mix e; 4,5 de RNA diluído em Nuclease-Free Water contendo 200 ng de RNA, resultando num volume final de 10 μ L por amostra, as quais foram incubadas no termociclador ProFlex™ Base (Applied Biosystems, Life Technologies, Singapore) nas seguintes condições: 37°C durante 30 min, 50°C durante 30 min, 70°C durante 15 min e finalmente 4°C para manter as amostras estável dentro do equipamento. Após ter feito o cDNA, as amostras foram armazenadas a -20°C para evitar as possíveis degradações, até o posterior processamento.

4.6.1. Reação em Cadeia da Polimerase (RT-qPCR)

Antes de começar o análise as amostras de cDNAs foram diluídas numa concentração de 5:10 com água livre de RNase, para diminuir o erro no momento do pipetagem. Para a análise de RT-qPCR, com a finalidade de detectar o miRNA alvo bta-miR-425-5p, foram utilizados primers específicos para o miRNA alvo e três controles endógenos RNT43 snoRNA, Hm/Ms/Rt T1 snRNA e bta-miR-99b. A concentração de trabalho utilizado de cada primer foram de 10 μ M. Foi preparado um Mix com 3 μ L Syber GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA) e 1 μ L Universal PCR Reverse Primer (NORGEN BIOTEK CORP., Canada) e armazenado no gelo. O cálculo do volume total de uso do Mix, foi de acordo ao número de amostras trabalhadas, e considerando o volume de reação por amostra como indica o protocolo do fabricante. Após, foi preparada e identificada uma placa de PCR de 384 poços, e com ajuda de uma pipeta multicanal, foram pipetados 1 μ L das amostras, 1 μ L dos primers específicos para o miRNA alvo e os controles endógenos por cada poço. Com a pipeta manual foram agregados 4 μ L do Mix para cada poço, obtendo no final um volume de 6 μ L por poço numa reação completa. Após isso, a placa foi coberta com folha plástica transparente e colocada no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio™ 6Flex (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA). O protocolo de PCR seguiu a configuração do “template”: uma incubação inicial de 95°C durante 5 min (*Hold stage*), seguida por 45 ciclos de incubação de 95°C durante 10 seg, após 60°C durante 30 seg, e por fim 70°C durante 30 seg (*PCR stage*) e no final 95°C durante 15 seg, 60°C durante 1min, 95°C durante 15 seg (*Melt Curve Stage*). Só foram considerados como miRNAs detectados quando a curva de amplificação teve início antes do ciclo 37.

4.7. Análise estatística

Para as análises estatísticas e gráficos de imagens foi utilizado o programa GraphPad Prism (versão 8.0.1.; GraphPad Software, San Diego, CA). Os dados foram previamente submetidos a avaliações das premissas estatísticas pelo teste de Shapiro-Wilk para comprovar a normalidade dos dados, também conseguiu-se identificar valores atípicos nos dados e foram excluídos para garantir a validade e a precisão das análises subsequentes. O teste estatístico utilizado foi o teste de Tukey - ANOVA para amostras com distribuição paramétrica, de acordo com a distribuição dos dados. Quando não mencionado, o nível de significância considerado foi $P < 0,05$. Para as análises moleculares, os dados de qPCR, foram analisados e foi selecionado

o melhor rendimento registrado do controle endógeno, considerando o Desvio Padrão. A partir disso, os dados de qPCR foram normalizados e calculado ΔCt com o controle endógeno selecionado para assegurar a comparabilidade dos resultados. Esse procedimento permitiu minimizar a variabilidade entre as amostras e garantir uma comparação adequada entre os diferentes grupos de estudo. Após, os dados normalizados foram transformados com $2^{-\Delta Ct}$ para a visualização dos resultados e geração de gráficos.

5. RESULTADOS

5.1. bta-miR-425-5p é expresso nos túbulos seminíferos e regiões epididimárias

Para compreender a expressão do bta-miR-425-5p no trato reprodutivo testículo-epidídimo, primeiramente avaliamos a expressão de bta-miR-425-5p nas regiões onde se origina a expressão, ou seja, os túbulos seminíferos e regiões epididimárias: cabeça, corpo e cauda. Porções de tecido foram submetidas para extração de miRNAs e análises de expressão gênica mediante RT-qPCR. A expressão gênica de bta-miR-425-5p desde os túbulos seminíferos e regiões do epidídimo demonstraram não ter diferenças significativas entre cada porção, mas o bta-miR-425-5p é expresso em todo esse trajeto (Figura 5).

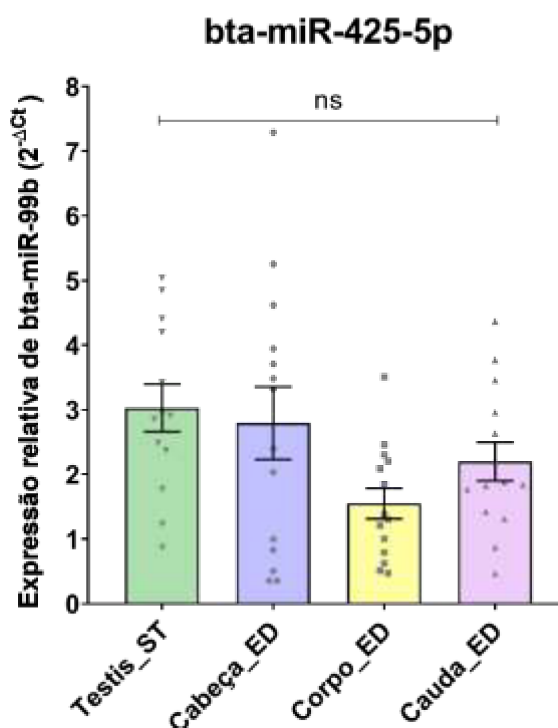


Figura 5. Gráfico demonstrando a expressão gênica de bta-miR-425-5p nos túbulos seminíferos (ST) e ductos epididimários (ED) das regiões cabeça, corpo e cauda. Os dados da expressão foram normalizados e transformados com bta-miR-99b como controle endógeno, teste de Tukey -ANOVA.

5.2. Presença do bta-miR-425-5p nas VEs

Antes de avaliar a expressão do bta-miR-425-5p nas VEs provenientes do túbulo seminífero e regiões de ductos epididimários, foi necessário avaliar a caracterização das VEs e conhecer sua distribuição em todo o trajeto do complexo testículo-epidídimo, para compreender a expressão biológica do miRNA alvo.

5.2.1. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs)

Para determinar a presença de VEs no fluido testicular e das porções do epidídimo, utilizamos o MET, NTA e citometria de fluxo como métodos de caracterização de VEs. Então mediante a MET foi possível notar a presença de estruturas em formato de “cup-shaped” ou redondas com centros côncavos, identificados como vesículas extracelulares ou exossomos do testículo e das porções epididimárias (Figura 6) representação da morfologia de VEs: A) VE do fluido testicular B) VE da cabeça do epidídimo C) VE do corpo do epidídimo D) VE da cauda do epidídimo. Com o NTA foi possível obter o valor da concentração (eixo Y = partículas/mL) e tamanho (eixo X = nm) das VEs, por cada porção avaliada (Figura 7). Os marcadores positivos de VEs: Syntenin, Alix e CD81 corroboraram a presença de VEs. Observou-se um maior número de eventos por μL em comparação com o controle negativo (PBS+ anticorpo), indicando um aumento na intensidade da fluorescência, o que revela presença de VEs (Figuras 8, 9,10). Além disso, foi corroborada a ausência de contaminação celular mediante o marcador de mitocôndria TOM 20 nas VEs isoladas, onde o número de eventos por microlitro é próximo ao controle (PBS + anticorpo). O controle positivo utilizado para TOM 20 foram espermatozoides (Figura 11).

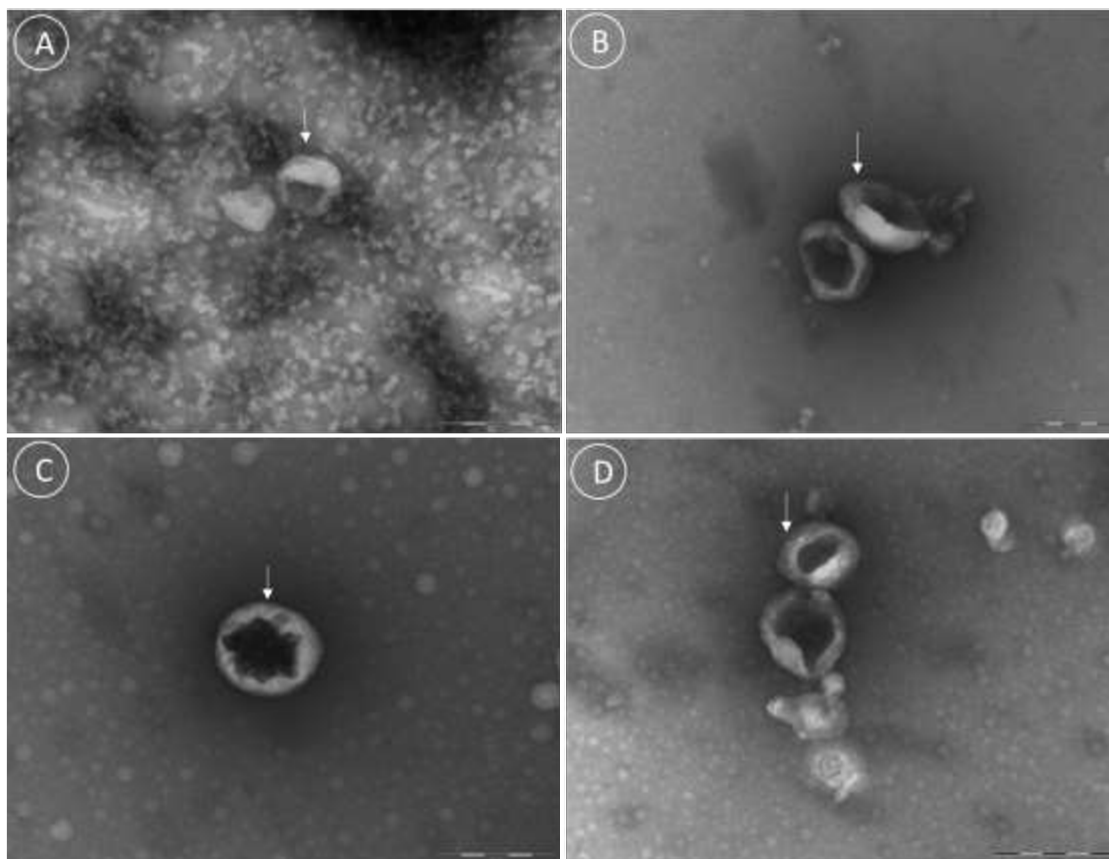


Figura 6. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de vesículas extracelulares, isoladas mediante ultracentrifugação do fluido testicular e fluido epididimário de touros. A) VE do fluido testicular B) VE da cabeça do epidídimo C) VE do corpo do epidídimo D) VE da cauda do epidídimo. As setas em branco apontam a estrutura da VE. As barras de escala têm 200 nm. (microscópio JEOL 100 CX II)

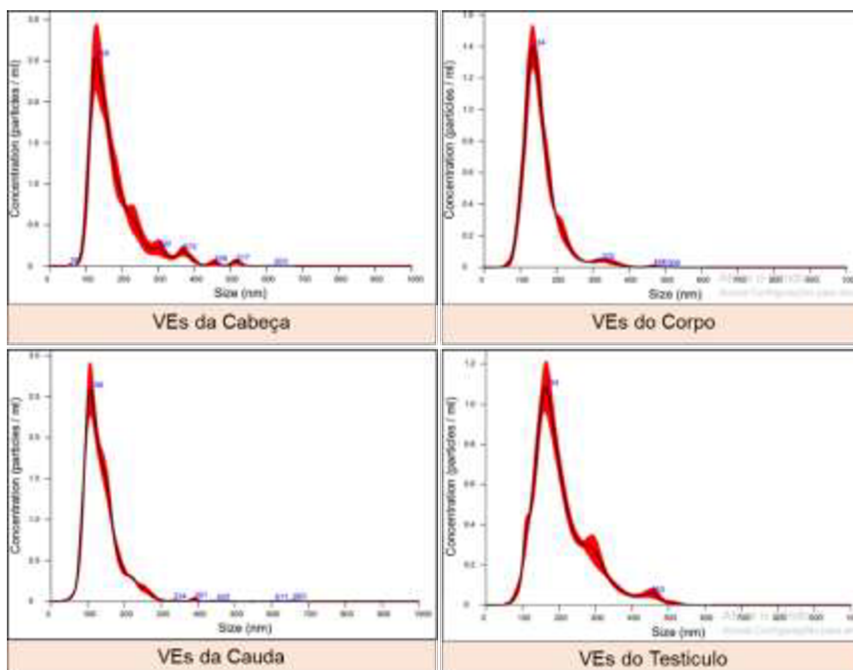


Figura 7. Distribuição do diâmetro por concentração das vesículas extracelulares (VEs) que foram isoladas a partir do fluido testicular e as regiões do epidídimo mediante a ultracentrifugação, avaliadas por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). A concentração de VEs é representada no eixo mediana (Partículas/mL) e o tamanho das VEs é representado no eixo X em nanômetro (nm).

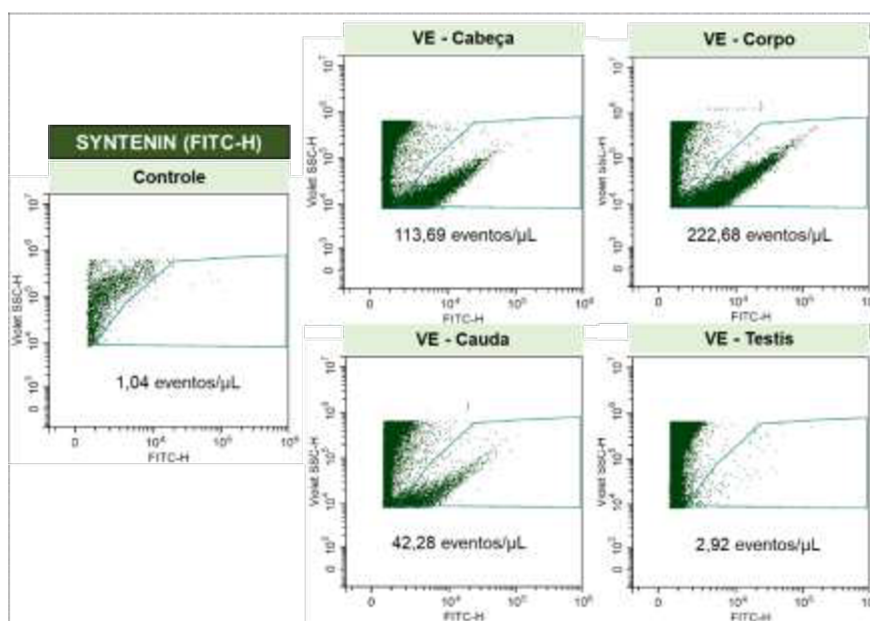


Figura 8. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) isoladas do epidídimo e testículo. Citometria de fluxo para identificar o marcador Syntenin, números de eventos positivos/ μL para

o marcador de vesícula usado, em comparação com o controle negativo. O volume de amostra usado foi de 50 μL .

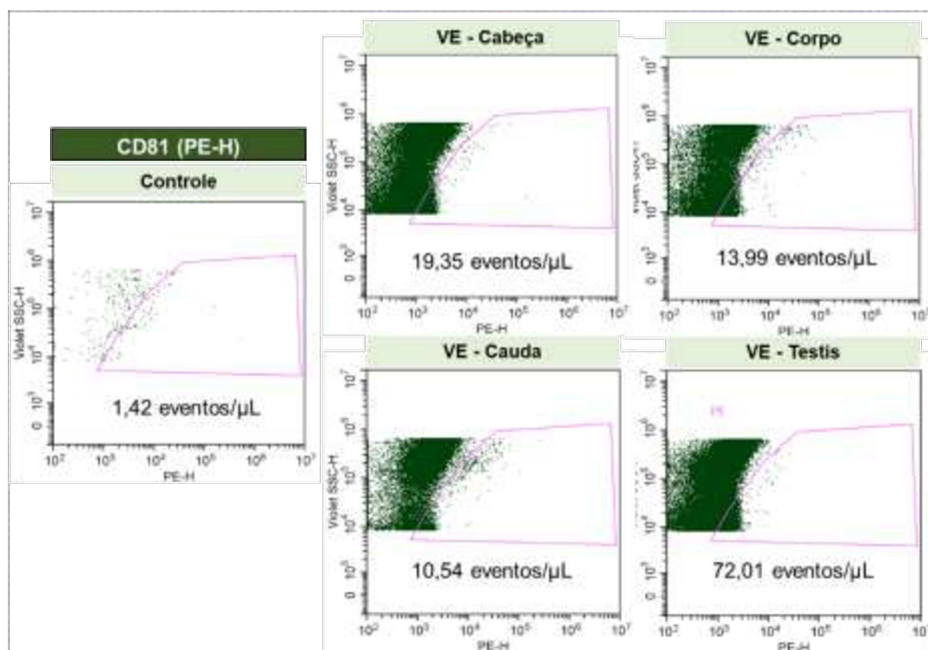


Figura 9. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) isoladas do epidídimo e testículo. Citometria de fluxo para identificar o marcador CD81, números de eventos positivos/ μL para o marcador de vesícula usado, em comparação com o controle negativo. O volume de amostra usado foi de 50 μL .

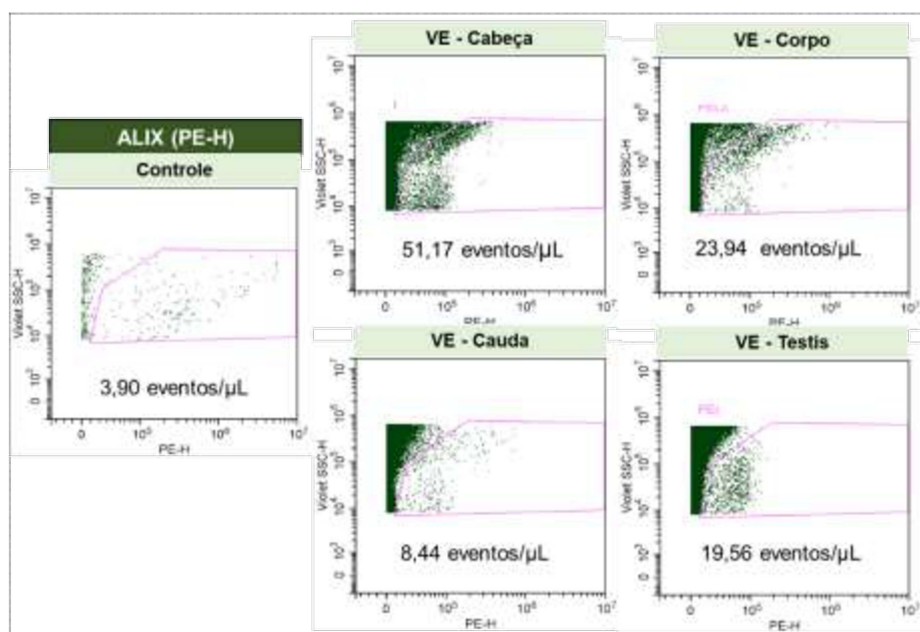


Figura 10. Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) isoladas do epidídimo e testículo. Citometria de fluxo para identificar o marcador ALIX, números de eventos positivos/ μL para o marcador de vesícula usado, em comparação com o controle negativo. O volume de amostra usado foi de 50 μL .

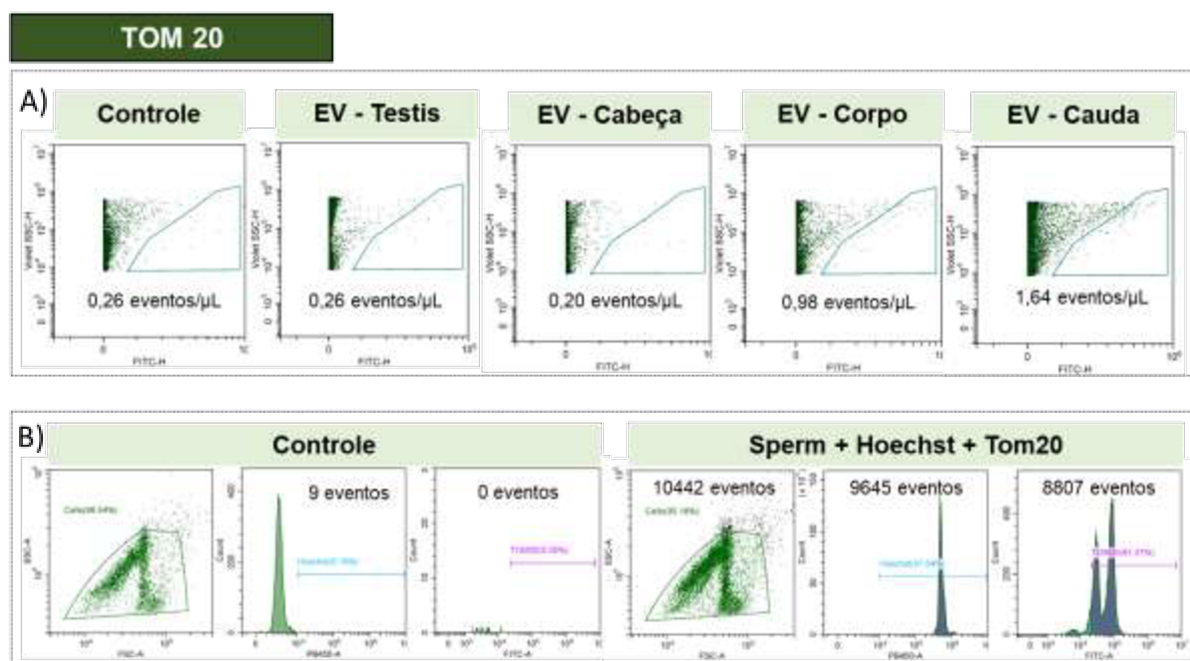


Figura 11. Citometria de fluxo: verificação da ausência de células nas vesículas extracelulares isoladas de diferentes regiões (testículo, cabeça, corpo e cauda). A) Os gráficos representam os eventos marcados com TOM 20 presentes dentro de uma população selecionada, em comparação com o controle (PBS + anticorpo). B) Controle positivo de TOM 20: foram utilizadas células espermáticas.

5.2.2. Não existem diferenças na concentração e tamanho de vesículas extracelulares no complexo testículo-epidídimo esquerdo e direito

Para saber se existe diferença dentro do par de testículos, foi avaliado o volume testicular por meio da equação proposta por Bailey e outros. (1998) $V = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{c}{2} \times \frac{L^2}{2}$, onde C representa o comprimento do testículo e L é a largura do testículo. O t-test de Student para amostras independentes revelou não ter diferenças no tamanho volumétrico dentro do par do testículo (testículo direito e testículo esquerdo) (Figura 12). Além disso foi feita a análise de interação

entre a classificação do testículo A e B com os dados obtidos da concentração e do tamanho de vesículas extracelulares obtidas pelo NTA. O test Sidak para comparação de multiplex fatores, revelou não ter diferença significativas entre a concentração e tamanho das VEs entre o par de testículo. Esses resultados demonstram que cada testículo A e B pode considerar-se como uma réplica para as seguintes análises (Figuras 13: a - b).

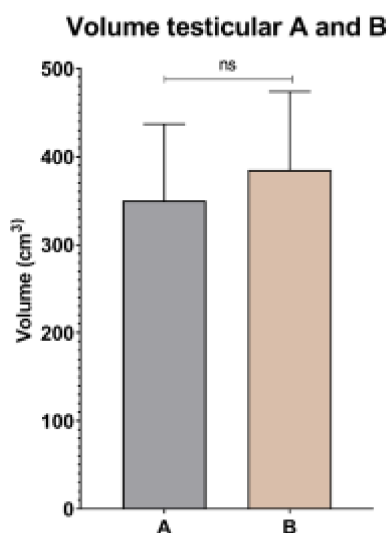
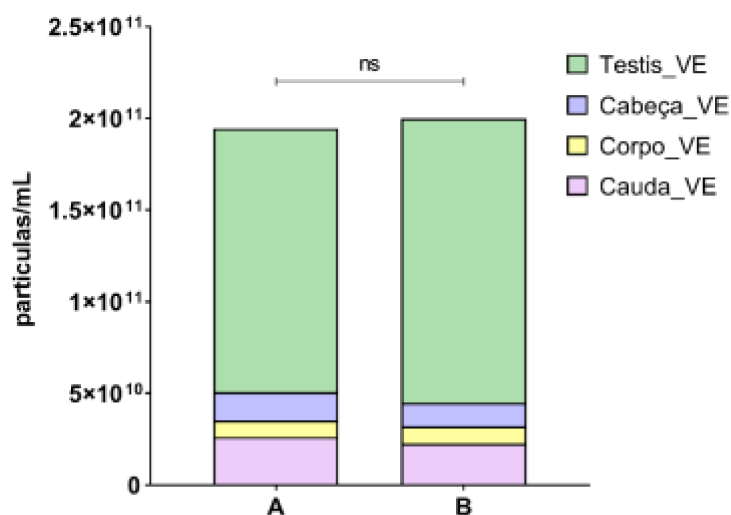


Figura 12. Representação da média e desvio padrão do volumem testicular, onde as letras representam: A (direito) e B (esquerdo). t-student teste: $P\text{-value} = 0,0694$, ($N = 5$ testículos).

a) Correlação entre volume testicular e concentração de vesículas extracelulares



b) Correlação entre o volume testicular e tamanho da vesícula extracelular

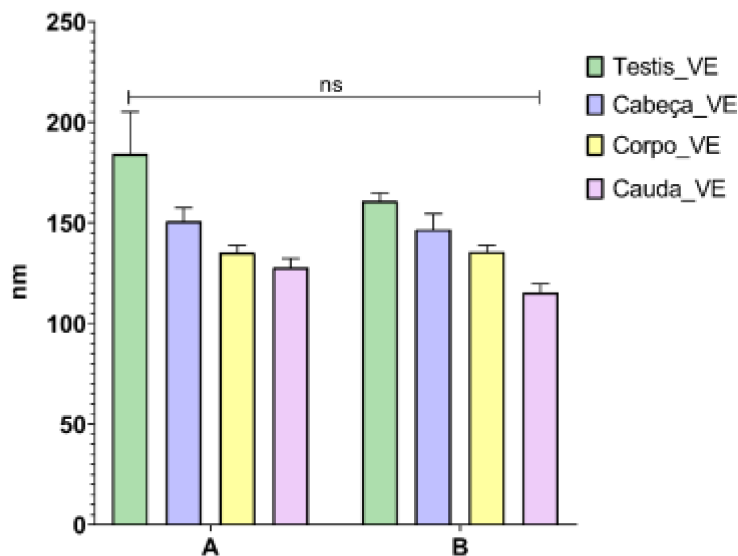


Figura 13. Análise de interação, teste Sidak para comparação de multiplex fatores: a) Correlação entre volume testicular e concentração de vesículas extracelulares. b) Correlação entre o volume testicular e o tamanho das vesículas extracelulares. A = testículos direito e B = testículo esquerdo.

5.2.3. Diminuição no tamanho e na concentração de vesículas extracelulares nos locais de formação e maturação espermática

Para compreender a riqueza de vesículas extracelulares do fluido testicular e das regiões epididimárias, mediante a Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) foram obtidos valores de tamanhos e concentração de VEs provenientes de 14 amostras. Foi calculado a média das Modas do tamanho das VEs obtido pelo NTA, obtendo um valor conhecido do tamanho de VEs por região. O teste Dunn de comparação multiplex revelou diferenças significativas de VEs entre os grupos. As VEs de maior tamanho se encontram no fluido testicular, sendo diferentes significativamente com VEs das regiões mais distais do epidídimo (corpo e cauda); as VEs da cabeça não foram significativamente diferentes em tamanho com as VEs do testículo, mas diferentes significativamente com VEs mais distais do epidídimo (cauda), não tendo diferenças significativas com VEs do corpo; na cauda encontra-se VEs de menor tamanho (Figura 14). A mesma análise foi feita para avaliações da concentração de VEs, o teste de comparação multiplex de Tukey demonstrou a diferença significativa em concentração de VEs no testículo em

comparação com todas as regiões do epidídimo. Em resumo, as VEs tiveram um padrão decrescente no tamanho desde o testículo até a região distal do epidídimo e o fluido testicular tem alta concentração de VEs (Figura 15).

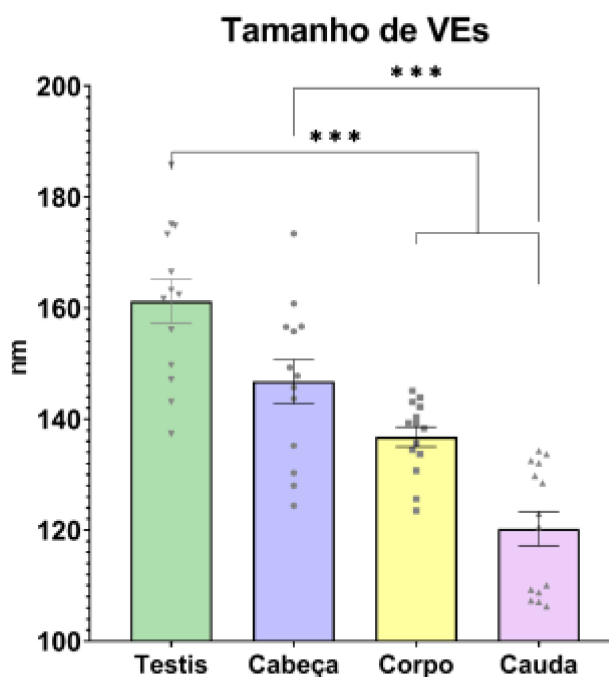


Figura 14. Diferenças do tamanho entre as VEs do testículo e regiões epididimárias. Média do tamanho (nm) de VEs (\bar{x} : testículo= 161,2 cabeça = 146,7 corpo = 136,8 cauda = 120,2), teste de Kruskal - Wallis.

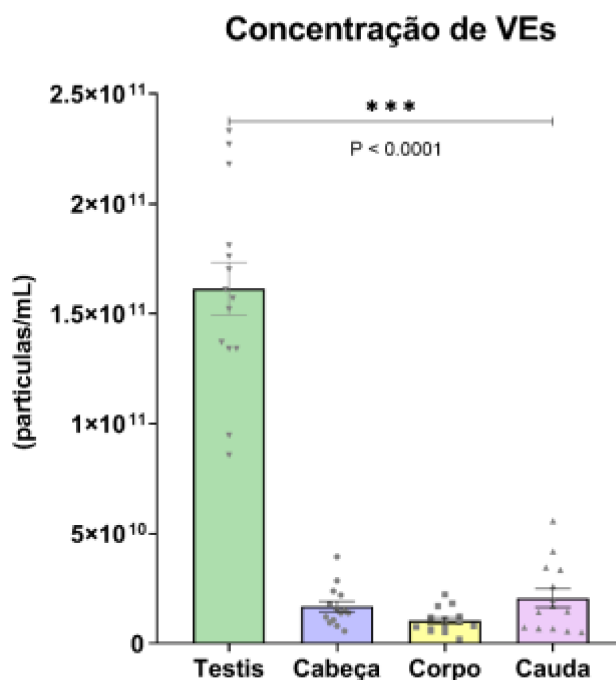


Figura 15. Diferenças da concentração entre as VEs do testículo e regiões epididimárias. Media da concentração de VEs (\bar{x} : testículo = $16,145 \times 10^{10}$ cabeça = $1,68 \times 10^{10}$ corpo = $1,0335 \times 10^{10}$ cauda = $2,0657 \times 10^{10}$ partículas/mL), teste Tukey - ANOVA.

5.2.4. As VEs da cauda epididimal contêm maiores níveis de expressão de bta-miR-425-5p

Após as avaliações de caracterização de VEs, finalmente seguiu-se com a expressão de bta-miR-425-5p mediante a RT-qPCR nas VEs que foram isoladas do fluido testicular e fluido epididimal das regiões cabeça, corpo, cauda. A análise estatística teste de Tukey - ANOVA demonstrou uma diferença significativa de expressão de bta-miR-425-5p nas VEs provenientes da cauda do epidídimo, sendo o maior local de expressão de bta-miR-425-5p nas VEs (Figura 16).

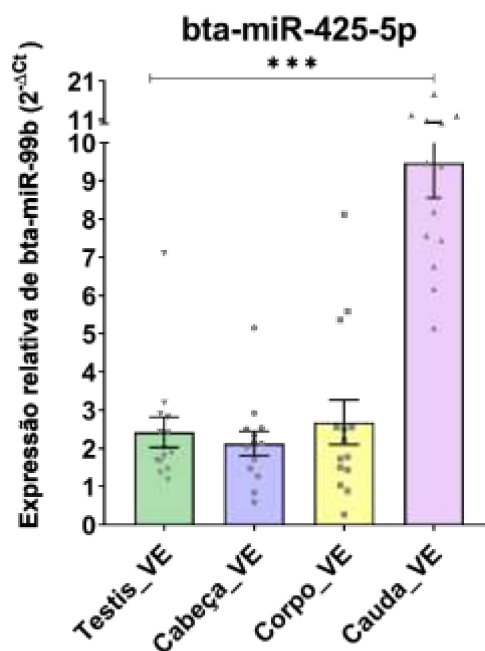


Figura 16. Expressão gênica de bta-miR-425-5p nos VEs de fluido testicular e das diferentes regiões do fluido epididimal (cabeça, corpo e cauda). Os dados da expressão foram normalizados e transformados com bta-miR-99b como controle endógeno. $P < 0,0001$ o teste utilizado foi Tukey – ANOVA.

5.3. bta-miR-425-5p é diferencialmente expresso nos espermatozoides do epidídimo

Foram isolados espermatozoides provenientes do fluido testicular e das regiões do cabeça, corpo e cauda epididimal. Conhecendo a origem de coleta do material biológico, foi necessário corroborar a ausência de células somáticas aplicando protocolos de tampão de lises de células somáticas (SCLB), para assegurar que a expressão de bta-miR-425-5p seja unicamente do espermatozoide e não assim de outro tipo celular. Na (Figura 17) se evidencia a presença e ausência de células somáticas antes e após o tratamento com o tampão de lise de células somáticas. Então foi obtida o número da média de células somáticas e espermatozoides de cinco campos, e foi expressa em (%), num microscópio de campo claro. Demonstrando que mediante o tratamento com o tampão de lise se conseguiu eliminar as células somáticas residuais, conseguindo um pellet limpo contendo só a maior população de espermatozoides (Tabela 1). Além disso, com o uso de microscopia eletrônica de transmissão, foi corroborado a ausência de VEs nos espermatozoides isolados e tratados com o tampão de lises para assegurar a extração

de RNA unicamente das células espermáticas e não de VEs. A ausência de VEs extracelulares após o tratamento com tampão de lise de células somáticas está demonstrado na Figura 18.

Tabela 1. Porcentagem de células somáticas antes e após do tratamento com o tampão de lises

| Presença de células somáticas por região (%) | | |
|--|--------------|--------------|
| | Sem lise (%) | Com lise (%) |
| Testis | 37,09 | 20,16 |
| Cabeça | 1,37 | 0,00 |
| Corpo | 4,46 | 0,11 |
| Cauda | 0,41 | 0,11 |

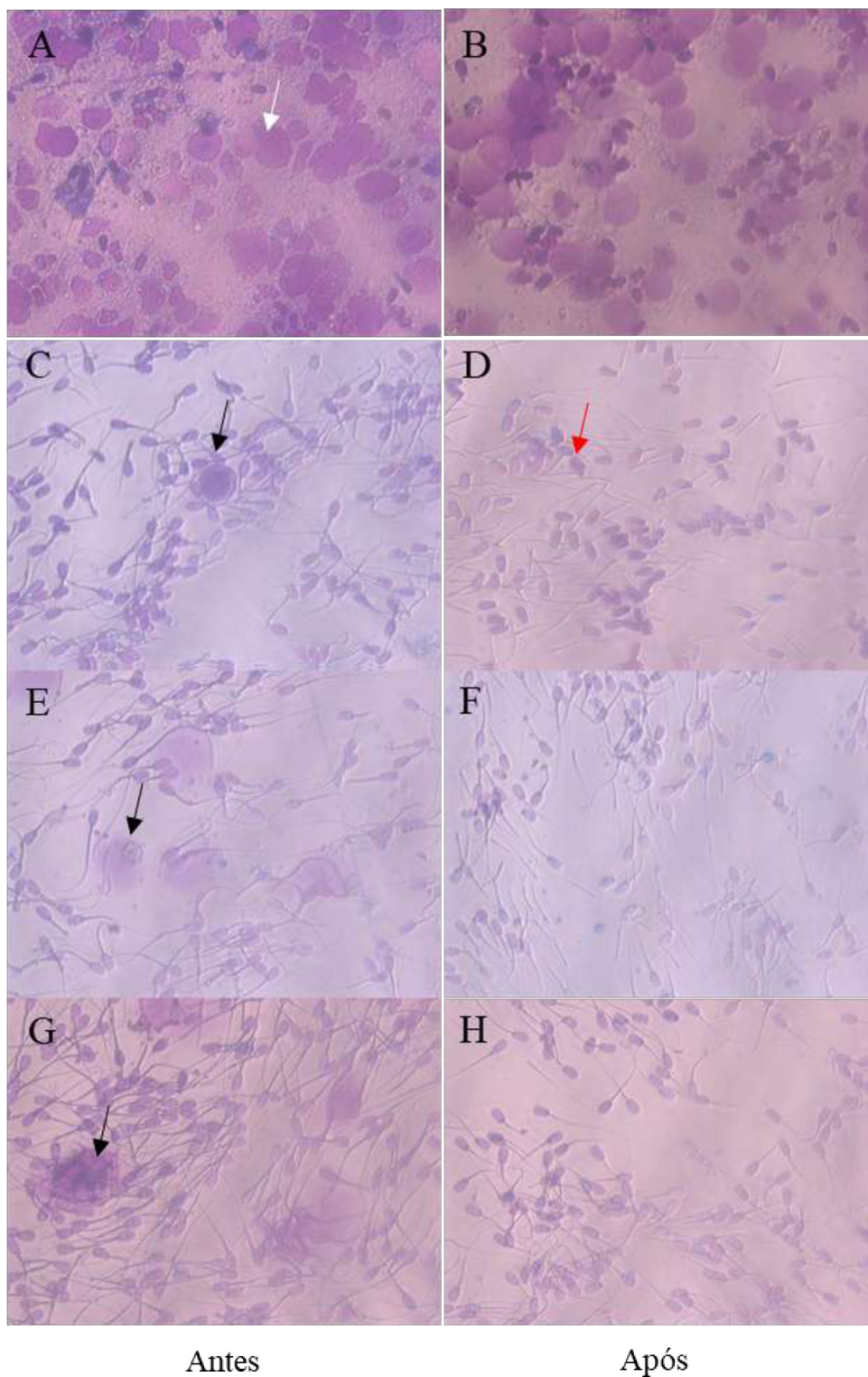


Figura 17. Coloração panótica rápida feita em esfregaços de espermatozoides antes e após passarem pelo processo de lises de células somáticas. Testículo (a – b), cabeça (c – d), corpo (e – f) e cauda (g – h). Seta branca (célula germinativa), seta preta (célula somática) e seta vermelha (espermatozoide). Imagens observadas na objetiva de X40.

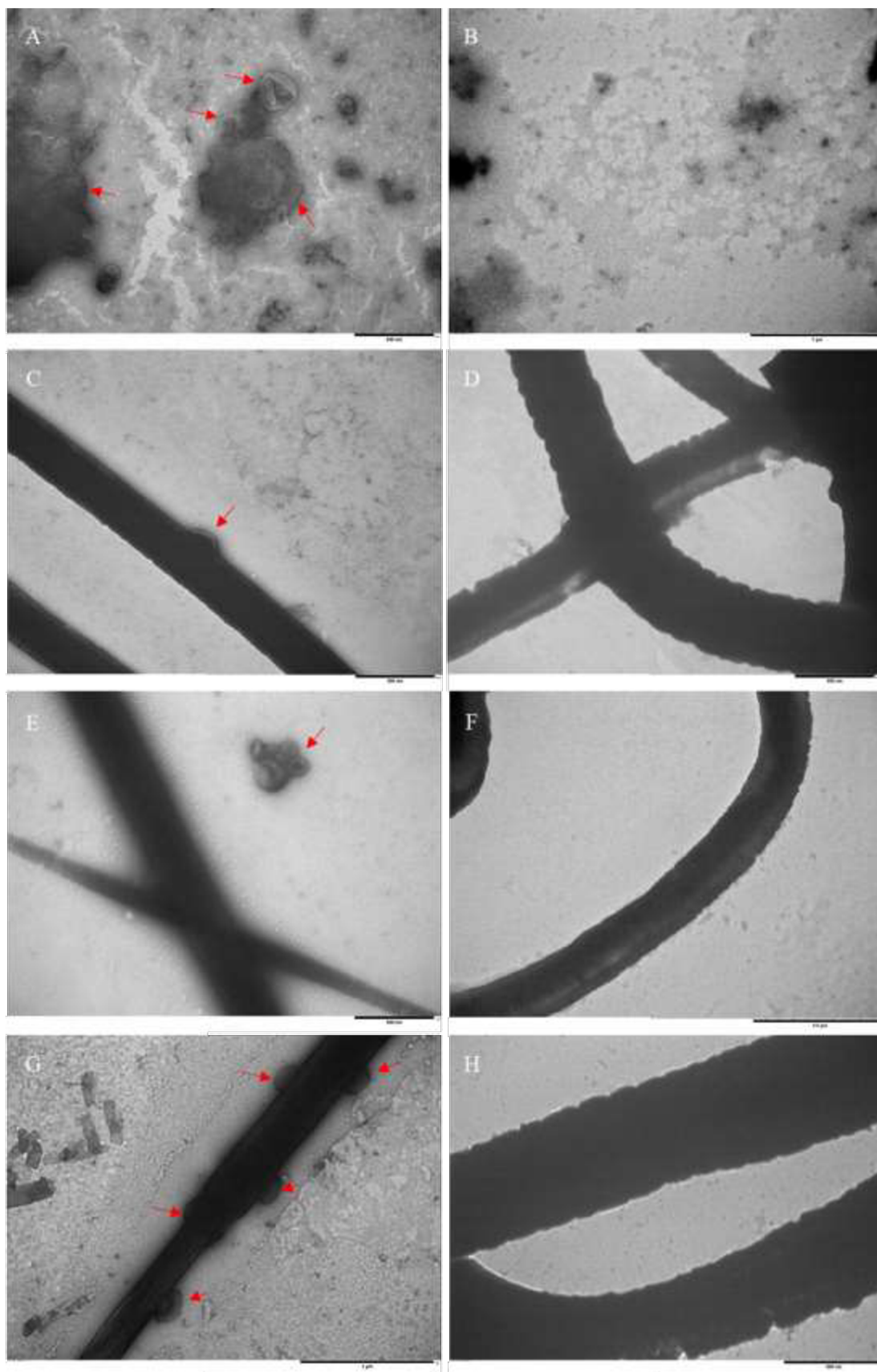


Figura 18. Microscopia Eletrônica de Transmissão das amostras tratadas com tampão de lises de células somáticas (SCLB). Fila esquerda: amostras antes de ser tratadas com SCLB e fila

direita: amostras após o tratamento com SCLB. (A, B) Testículo, (C, D) Cabeça epidídimo, (E, F) Corpo epidídimo, (G, H) Cauda epidídimo. Setas vermelhas indicam as vesículas extracelulares visualizadas pela MET, (microscópio Hitachi HT 7700).

Finalmente, foi feita a quantificação de bta-miR-425-5p mediante RT-qPCR nos espermatozoides isolados do testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Estatisticamente a expressão de bta-miR-425-5p nos espermatozoides do testículo não ocorreu, e a quantificação de bta-miR-425-5p nos espermatozoides do cabeça foram maiores que os espermatozoides do corpo. Os espermatozoides do corpo tiveram a menor quantificação de bta-miR-425-5p em comparação com espermatozoides do cabeça e cauda. E espermatozoides da cauda tiveram a maior quantificação de bta-miR-425-5p em comparação com os espermatozoides do testículo, cabeça e corpo. Estes resultados revelaram flutuações da quantificação do bta-miR-425-5p nos espermatozoides durante sua formação e no processo de maturação espermática (Figura 19).

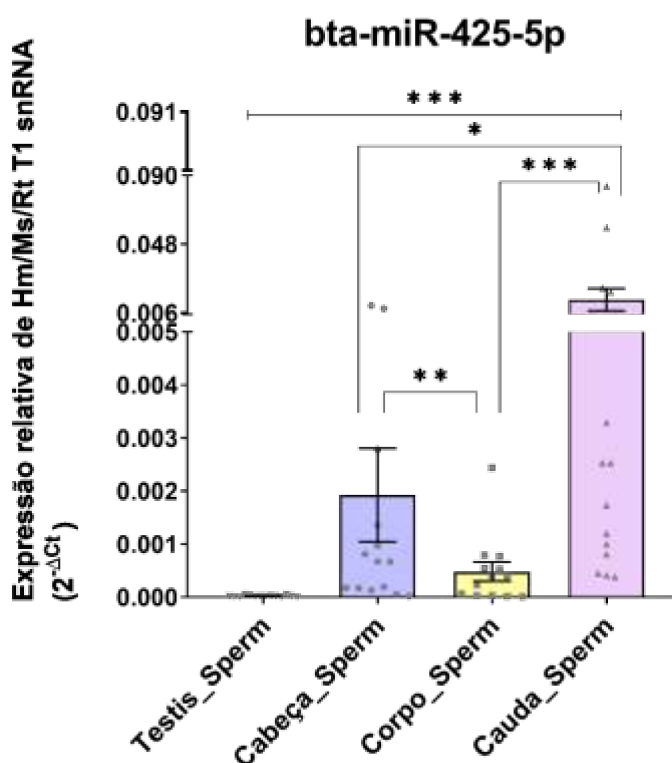


Figura 19. Quantificação do bta-miR-425-5p em espermatozoides isolados do testículo e regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda). Os dados da expressão foram normalizados e transformados com Hm/Ms/Rt T1snRNA como controle endógeno, o teste utilizado foi Tukey - ANOVA.

6. DISCUSSÃO

Se sabe que durante a passagem pelo trato reprodutivo masculino, os espermatozoides atravessam diversas modificações estruturais e aquisição de moléculas como miRNAs, para ser entregue ao ovócito (BARRACHINA et al., 2022). Os miRNAs são moléculas pequenas capazes de modular a expressão gênica, devido à sua capacidade de regulação de mRNAs (BOFILL-DE ROS; VANG ØROM, 2024). Anteriormente, bta-miR-425-5p encontrados nos espermatozoides ejaculados de touros, foi sugerido como um possível regulador da proliferação celular no desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* (DE SOUZA, 2019). Surpreendentemente existe abundante bibliografia que mostra o papel regulador deste miRNA na proliferação celular de células cancerígenas (YAN et al., 2017; CHEN et al., 2017; ZHANG et al., 2017; FANG et al., 2017; LU et al., 2019; LIU et al., 2020; RODE et al., 2021; WU et al., 2021; WU et al., 2022). Cenários semelhantes, o desenvolvimento embrionário inicial e células cancerígenas são situações de marcada proliferação celular, no qual bta-miR-425-5p poderia ser o principal agente regulador destes eventos biológicos. Neste trabalho sugerimos a aquisição do bta-miR-425-5p nos espermatozoides durante sua passagem pelo ducto epididimário no processo de maturação espermática.

Primeiramente, para a expressão gênica de bta-miR-425-5p, foram coletados e lavados os túbulos seminíferos e ductos epididimários, para retirar os espermatozoides contidos no interior. No entanto, sempre consideramos a possibilidade de que possam ter permanecido restos de espermatozoides que não foram eliminados. Embora, quando comparamos a quantidade de RNA obtido de células somáticas de tecido com RNA de espermatozoides, a quantidade de RNA é 10 vezes mais abundante nas células somática que nas germinativas, portanto, acreditamos que não poderia ser um problema para as análises de expressão no tecido. Continuando com a análise, os túbulos seminíferos e ductos epididimários das regiões: cabeça, corpo e cauda, apresentaram expressão do bta-miR-425-5p, mas não foi observada expressão com diferença significativa entre as porções avaliadas. A presença de bta-miR-425-5p foi registrada no tecido testicular de Wandong bull mediante sequenciamento e confirmada por RT-qPCR (LIU et al., 2022). Também se notou sua presença nas regiões do epidídimo do camundongo e humano mediante sequenciamento, contendo maiores níveis de expressão nas células do cabeça do epidídimo em camundongo, embora o valor de FDR (False Discovery Rate) foram maiores a 0,05. (NIXON et al., 2015). Além disso, a presença de bta-miR-425-5p foi relacionada com genes envolvidos na espermatogênese testicular (LIU et al., 2022). Por outro lado, a expressão de miRNAs em geral no ducto epididimário é mais complexa de

compreender, devido às funcionalidades de cada região. MiRNAs expressos diferencialmente na região do cabeça, corpo e cauda são muito poucos, como demonstrado para o miR-425-5p que não é expresso diferencialmente em camundongos (NIXON et al., 2015). A expressão em seu conjunto de miRNAs no epidídimo, tem um padrão heterogêneo entre as regiões, como foi demonstrado em tecido e *in-vitro* (BROWNE et al., 2018). Essas flutuações são conhecidas com “upregulation” e “downregulation” de tal forma que a expressão de genes alvos dos miRNAs é afetada e diferentemente para cada região do epidídimo em Cattle yak (CY) um híbrido de bovino e Yak (ZHAO et al., 2021). Então particularmente bta-miR-425-5p se encontrou expresso no tecido de túbulos seminíferos, cabeça, corpo e cauda do epidídimo, com valores extremos dentro de cada região avaliada, confirmando o comportamento de expressão heterogênea no tecido.

Para avaliar a expressão (quantidade) de bta-miR-425-5p nas VEs isoladas do fluido testicular e o fluido de cada região epididimária, foi feita a coleta dos fluidos mediante dissecação e imersão do tecido no PBS. Este tipo de coleta não permite separar VEs proveniente de diferentes tipos celulares, mas é um método utilizado para avaliar VEs para cada porção do epidídimo (BELLEANNÉE et al., 2013). Quando se quer avaliar só VEs da região da cauda epididimal é possível ter uma seleção de VEs mediante a coleta por fluxo retrógrado (BELLEANNÉE et al., 2010). Neste trabalho foi conveniente de acordo com nossos objetivos, utilizar a coleta por dissecação e imersão, para obtenção de VEs das diferentes porções. Então, as VEs foram isoladas e logo caracterizadas mediante NTA, MET e citometria de fluxo. As técnicas de caracterização utilizadas demonstram com sucesso o isolamento de VEs das diferentes porções, como foi demonstrado (FRANCHI et al., 2016). Além disso, foi feita uma comparação de concentração e tamanho de VEs nas diferentes porções, para compreender melhor a dinâmica das VEs no testículo e epidídimo. Estes resultados demonstraram que no fluido testicular existe maior concentração e tamanho de VEs em comparação com VEs das regiões epididimárias. Provavelmente, isso esteja relacionado pela função biológica que acontece nos testículos, local de formação e geração dos espermatozoides, portanto, alberga um nicho de complexos celulares qual permanecem em atividades de diferenciação e comunicação celular, interagindo mediante contato direto de célula a célula, fatores secretados por células e transferência intercelular que são as VEs (MA et al., 2023). Devido à intensa atividade celular no testículo, a comunicação celular deve ser coordenada e seletiva, como demonstrado por (CHOY et al., 2022). Quando as VEs são de origem testicular existe ótima afinidade de captação das VEs pelas espermatogônias, células de Sertoli e espermatozoides, o que não acontece com VEs de origem diferente. Visto

que a comunicação é particularmente seletiva, as VEs são mediadoras desta comunicação. VEs de células de Sertoli contém miRNAs envolvidos no ciclo celular e reparo do DNA (TAN et al., 2022) e também são mediadores da proliferação e diferenciação de células tronco espermatogonial (WANG et al., 2023). Então, a alta concentração de VEs é necessária para uma comunicação acertada entre as células que compõem o epitélio germinativo logrando acontecer processos de espermatogêneses com sucesso.

No trajeto do duto epididimário as VEs diminuem em tamanho desde o cabeça, corpo até a cauda. Quanto à concentração, não foi observada diferenças significativas entre as regiões. Quando falamos da concentração e tamanho de VEs, faz referência à produção das VEs pelas células epiteliais. Então, a produção de VEs é definida pela distribuição das células que compõem o epitélio epididimário: células claras (CC), principais (CP) e basais (CB) (CHEN; ALVES; BELLEANNÉE, 2021; BATTISTONE et al., 2019 e 2023). Além disso, existem subtipos de populações de CP e CC, que podem tornar o ambiente luminal único em cada região epididimal (RINALDI et al., 2020). Inclusive o conteúdo das VEs pode se tornar diferentes para cada região (BROWNE et al., 2018; BARRACHINA et al., 2022), fornecendo ambientes luminiais de maturação (cabeça e corpo) e armazenamento (cauda) para os espermatozoides (NEYROUD et al., 2021). A formação de VEs implica tráfico de membrana celular, os quais genes envolvidos foram reportados no epidídimo Dab2, Ap1s3, Arf3, Stx7, Cdc42se2, o que corrobora a ativa atividade celular de tráfico e renovação de membrana celular do epitélio epididimal para a síntese de VEs (FARKAŠ, 2015). A análise de expressão genica (quantidade) nas VEs, demonstrou que bta-miR-425-5p se encontra em VEs do testículo e das regiões do epidídimo, embora com maior quantidade significativa para VEs da região da cauda epididimal. Nossos resultados coincidem com outras publicações, miR-425-5p tem mais níveis de expressão nas VEs da cauda que do cabeça epididimal (BELLEANNÉE et al., 2013). Provavelmente a ascendência de expressão de VEs contendo bta-miR-425-5p seja para assegurar a entrega de VEs para os espermatozoides, que permanecem no estado quiescente nessa região (FREITAS; VIJAYARAGHAVAN; FARDILHA, 2017).

Quando analisamos a quantificação de bta-miR425-5p nos espermatozoides a expressão se torna mais dinâmica e heterogênea. Nos espermatozoides do testículo não foi registrada expressão relativa de bta-miR-425-5p, sendo a mais baixa entre todas as porções avaliadas. As maiores expressões foram para espermatozoides do epidídimo. Nos espermatozoides da região do cabeça a quantidade relativa do bta-miR-425-5p foi significativamente mais alta que espermatozoides do corpo, e a quantidade relativa de bta-miR-425-5p nos espermatozoides do

corpo foram mais baixas que na cabeça e cauda. Finalmente a quantidade relativa de bta-miR-425-5p dos espermatozoides da região da cauda tiveram a maior expressão em comparação com o cabeça e cauda. Similares resultados foram obtidos por (NIXON et al., 2015), mediante sequenciamento conseguiu maiores expressões do bta-miR-425-5p nos espermatozoides da região da cauda, cabeça e depois corpo. Interessantemente o bta-miR-425-5p também estão presentes nos espermatozoides ejaculados (DE SOUZA, 2019; ALVES et al., 2021). Provavelmente, após os espermatozoides atravessarem os locais específicos do processo de maturação, eles entram na cauda onde serão armazenados e estarão submersos em VEs que contêm bta-miR-425-5p. Com o uso do MET se observou interação entre VEs e a peça intermediária e cauda dos espermatozoides isolados de cauda do fluido epididimal (Figura 17. G), demonstrando assim uma possível justificativa do aumento da expressão diferencial de miR-425-5p nos espermatozoides da cauda, e nos espermatozoides ejaculados, como mencionado anteriormente.

O comportamento de aumento e diminuição na quantidade de miRNAs nas regiões é conhecido como reprogramação de RNA durante a maturação pós-testicular (SHARMA, 2018 e 2019). MiRNAs expressos na região caudal tem genes alvos que estão particularmente relacionados com desenvolvimento embrionário (NIXON et al., 2015), atividade de transporte de membrana, funções relacionadas na resposta imune, fertilização, modificação de proteínas (WU et al., 2021). Enquanto miRNAs expressos no cabeça, tem genes alvos para transporte de ions, atividade betaglucoronidase, enriquecimento de junções “tight” e adesão focal; e no corpo com genes alvos, para funções de permeabilidade da membrana plasmática, motilidade e fertilização, conforme observado nas ovelhas (WU et al., 2021) além de agregação exclusiva de proteínas na membrana de espermatozoides e aquisição de motilidade (BASKARAN; PANNER; AGARWAL, 2020).

O comportamento de aumento e diminuição, ou melhor dito, *downregulation* e *upregulation* dos miRNAs também foi analisado mediante RNAseq, foi demonstrado que muitos miRNAs são “upregulated” nas regiões distais do epidídimo em contraste com suas regiões proximais em cattleyak (ZHAO et al., 2021; Wang et al., 2022), dados similares com os nossos.

Em resumo, a expressão relativa de bta-miR-425-5p nos espermatozoides aumentou da cabeça do epidídimo até a cauda. No entanto, poderia haver uma maior interação entre as VEs e os espermatozoides, o que permitiria e garantiria um aumento de bta-miR-425-5p nos espermatozoides da cauda epididimal (Figura 20). Os resultados indicam que este miRNA é agregado ao espermatozoide durante o processo de maturação pós-testicular, porém seria

interessante realizar estudos de interação entre VE e espermatozoide, para conhecer a origem celular do bta-miR-425-5p no epitélio, e ver o potencial deste miRNA sobre o desenvolvimento embrionário.

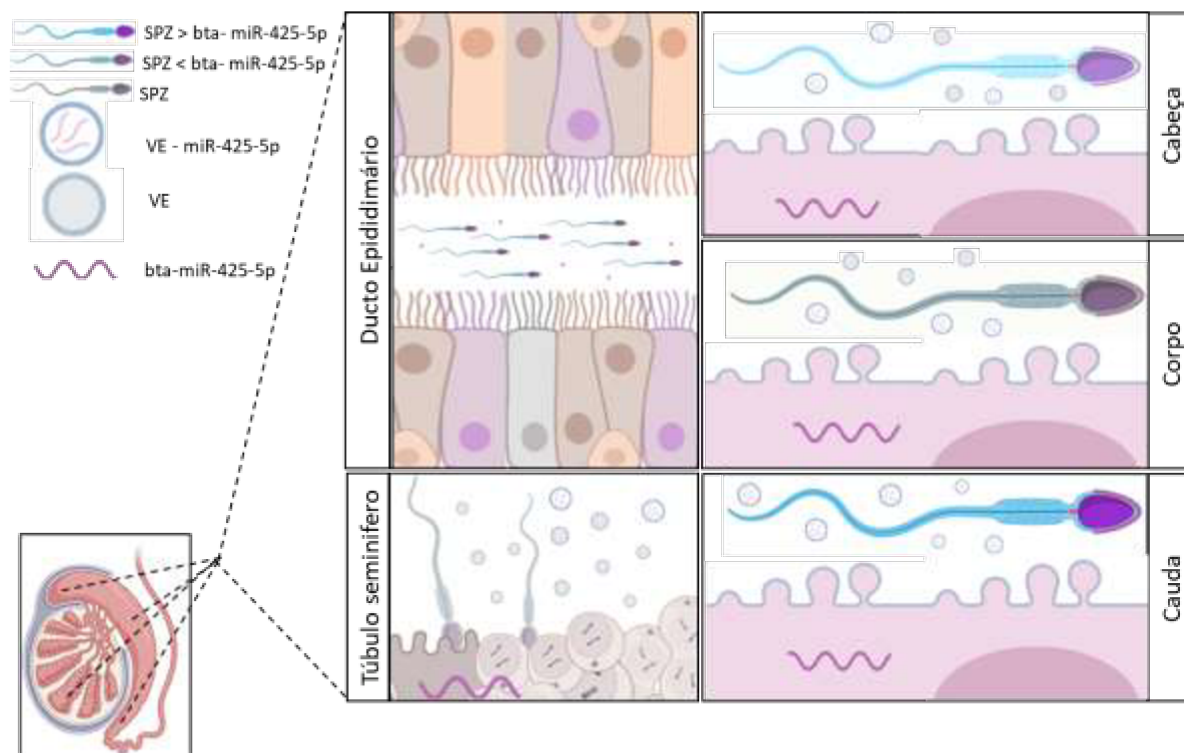


Figura 20. Representação da expressão de bta-miR-425-5p no tecido, VEs e espermatozoides. (Fonte: desenho próprio).

Túbulo seminífero: Maior tamanho e concentração de VEs e Expressão de bta-miR-425-5p em túbulos seminíferos.

Cabeça: Agregação de bta-miR-425-5p ao espermatozoide.

Corpo: Decréscimo na expressão de bta-miR-425-5p no espermatozoide.

Cauda: Maiores níveis de expressão de bta-miR-425-5p tanto nos espermatozoides quanto nas VEs.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo foi demonstrado que não houve diferenças significativas na expressão de bta-miR-425-5p em tecido do túbulos seminíferos e ductos epididimários da cabeça, corpo e cauda.

As vesículas extracelulares da região da cauda apresentam maiores níveis de expressão de bta-miR-425-5p em comparação às outras regiões do testículo, cabeça e corpo do epidídimo.

Os espermatozoides da cauda do epidídimo possuem maior quantidade de bta-miR-425-5p do que no testículo, cabeça e cauda do epidídimo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. B. R. et al. **Theriogenology**. v. 161, p. 26-40. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.015>
- ANDRADE, G. M. et al. Oxygen tension modulates extracellular vesicles and its miRNA contents in bovine embryo culture medium. **Molecular Reproduction and Development**. v. 86, n. 8, p. 1067-1080. 2019. <https://doi.org/10.1002/mrd.23223>
- AOKI, S. et al. microRNAs associated with the quality of follicular fluids affect oocyte and early embryonic development. **Reproductive medicine and biology**. v. 23, n. 1, e12559. 2024. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12559>
- BAILEY, T. L. et al. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**. v. 49, n. 3, p. 581–594. 1998. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00009-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00009-0)
- BANKS, W. J. **Applied Veterinary Histology**. 3.Ed. Mosby: Sant Louis, 1993. 527p.
- BARRACHINA, F. et al. Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. **Human Reproduction**. v. 37, n. 4, p. 651–668, 2022. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac015>
- BASKARAN, S.; PANNER S. M. K.; AGARWAL, A. Chapter Four - Exosomes of male reproduction. **Advances in Clinical Chemistry, Elsevier**. v. 95, p. 149-163, 2020. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.08.004>
- BATTISTONE, M. A., et al. Novel role of proton-secreting epithelial cells in sperm maturation and mucosal immunity. **Journal of cell science**. v. 133, n. 5. 2019. <https://doi.org/10.1242/jcs.233239>
- BATTISTONE, M. A. et al. Immunoregulatory mechanisms between epithelial clear cells and mononuclear phagocytes in the epididymis. **Andrology**. v. 12, n. 5, p. 949–963. 2024. <https://doi.org/10.1111/andr.13509>
- BELLEANNÉE, C. et al. Role of purinergic signaling pathways in V-ATPase recruitment to apical membrane of acidifying epididymal clear cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v. 298, n. 4. 2010. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00460.2009>
- BELLEANNÉE, C. et al. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. **Biology of reproduction**. v. 89. n. 2, p. 30. 2013. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110486>
- BELLEANNÉE C. et al. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. **Asian journal of andrology**. v. 17, n. 5, p. 730 –736. 2015. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.155532>
- BOFILL-DE ROS, X.; VANG ØROM, U. A. Recent progress in miRNA biogenesis and decay. **RNA biology**. vol. 21, n. 1, p. 1–8. 2024. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2288741>
- BRETON, S.; BROWN, D. Regulation of Luminal Acidification by the V-ATPase. **Physiology**. v. 28, p. 318 –329. 2013. <https://doi.org/Y-00007-2013>

- BRETON, S. et al. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. **Asian J Androl.** v.18, p. 3–9. 2016. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.165946>.
- BROWNE, J. A. et al. Region-specific microRNA signatures in the human epididymis. **Asian journal of andrology.** v. 20, n. 6, p. 539–544. 2018. https://doi.org/10.4103/aja.aja_40_18
- CAI, Y. et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. **Genomics, proteomics & bioinformatics.** v. 7, n. 4, p. 147–154. 2009. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3)
- CHEN, F.F. et al. "miR-425-5p Inhibits Differentiation and Proliferation in Porcine Intramuscular Preadipocytes". **International Journal of Molecular Sciences.** v. 18, n. 10, p. 2101. 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18102101>
- CHEN, H.; ALVES, M. B. R.; BELLEANNÉE, C. Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. **Human reproduction update.** v. 28, n. 1, p. 51–66. 2021. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab029>
- CHEN, H; ALVES, M.B.R; BELLEANNÉE, C. Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. **Human reproduction,** v. 28, p. 51-66, 2022. <https://doi:10.1093/humupd/dmab029>
- CHOY, K. H. K. et al. The repertoire of testicular extracellular vesicle cargoes and their involvement in inter-compartmental communication associated with spermatogenesis. **BMC Biol.** v. 20, n. 78. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01268-5>
- CONINE, C. et al. Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice. **Developmental Cell.** v. 46, p. 470–480. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.024>
- COOPER, G.M. **The cell: a molecular approach.** 8 ed. New York: Boston, 2019.
- CORREIA, M. et al. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. **International journal of molecular sciences.** v. 20, n. 24, p. 6249. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>
- CURRY, E.; SAFRANSKI, T. J.; PRATT, S. L. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. **Theriogenology.** v. 76, n. 8, p. 1532–1539. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.025>
- DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of Epididymal Secretory Proteins for Spermatozoa Maturation. **Microscopy Research and Technique.** v. 61, p. 7-17. 2003. <https://doi:10.1002/jemt.10312>
- DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction (Cambridge, England),** v. 147, n. 2, p. 27–42. 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0420>
- DE SOUZA, L. **Micro-RNAs Espermáticos correlacionados com a fertilização e o desenvolvimento inicial de embriões bovinos (Bos taurus) in vitro.** 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular Estrutural Aplicada) - Faculdade de Umuarama, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2019.

- FANG, F. et al. MiR-425-5p promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells through SCAI-mediated dysregulation of multiple signaling pathways. **Oncotarget**. v. 19, p. 31745-31757. 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15958>
- FARKAŠ, R. Apocrine secretion: New insights into an old phenomenon. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1850, n. 9, p. 1740-1750. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.003>.
- FRANCHI, A. et al. Uterosome-like vesicles prompt human sperm fertilizing capability. **Molecular human reproduction**. v. 22, n. 12, p. 833-841. 2016. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw066>
- FREITAS, M. J.; Vijayaraghavan, S.; Fardilha, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. **Biology of Reproduction**. v. 96, n. 1, p. 2-12. 2017. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337>
- GAO, D.Y. et al. Coupling of TRPV6 and TMEM16A in epithelial principal cells of the rat epididymis. **J Gen Physiol**. v. 148, n. 2, p. 161-182. 2016. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611626>
- GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**. v. 5, n. 2, p. 204-218. 2017. <https://doi.org/10.1111/andr.12320>
- GRIFFITHS, G. S. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. **Molecular reproduction and development**. v. 75, n. 11, p. 1627-1636. 2008. <https://doi.org/10.1002/mrd.20907>
- HALARI, C. D. et al. Decorin-induced, preeclampsia-associated microRNA-512-3p restrains extravillous trophoblast functions by targeting USF2/PPP3R1 axis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 10. 2022. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1014672>
- HARROUN, T. A.; KATSARAS, J.; WASSALL, S. R. Cholesterol is found to reside in the center of a polyunsaturated lipid membrane. **Biochemistry**. v. 47, n. 27, p. 7090-7096. 2008. <https://doi.org/10.1021/bi800123b>
- HERMO, L.; DWORKIN, J.; OKO, R. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. **The American journal of anatomy**. v. 183, n. 2, p. 107-124. 1988. <https://doi.org/10.1002/aja.1001830202>
- HUANG, L. et al. MiR-100 promotes the proliferation of spermatogonial stem cells via regulating Stat3. **Molecular Reproduction and Development**. v. 84, n. 8, p. 693-701. 2017. <https://doi.org/10.1002/mrd.22843>
- JIN, Y. et al. Extracellular signals regulate the biogenesis of extracellular vesicles. **Biol Res**. v. 55, n. 35. 2022. <https://doi.org/10.1186/s40659-022-00405-2>
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica Texto e Atlas**. 14. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2023. 592 p.
- KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histology and Cell Biology**. 4th ed. Pennsylvania: Philadelphia, 2016. 611p.

- KIM, et al. "Integrated miRNA Changes in Canine Testis and Epididymis According to Age and Presence of Cryptorchidism". **Animals**. v. 13, n. 8, p. 1390. 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13081390>
- LIMA, J. et al. MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **Einstein**. v. 19, eRB5996. 2021. https://10.31744/einstein_journal/2021RB5996
- LIU, D. et al. Hsa-miR-425-5p promotes tumor growth and metastasis by activating the CTNND1-mediated β -catenin pathway and EMT in colorectal cancer. **Cell Cycle**. V. 19, n. 15, p. 1917–1927. 2020. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1783058>
- LIU, H. et al. Comprehensive Sequencing Analysis of Testis-Born miRNAs in Immature and Mature Indigenous Wandong Cattle (*Bos taurus*). **Genes**. v. 13, p. 2185. 2022. <https://doi.org/10.3390/genes13122185>
- LU, Y.; WU, X; WANG, J. Correlation of miR-425-5p and IL-23 with pancreatic cancer. **Oncology Letters**. v. 17, p. 4595-4599. 2019. <https://doi:10.3892/ol.2019.10099>
- LUO, X. et al. Characterization and proteomics of chicken seminal plasma extracellular vesicles. **Reproduction in domestic animals**. v. 57, n. 1, p. 98 - 110. <https://doi.org/10.1111/rda.14033>
- MCIVER, S.C. et al. miRNA and mammalian male germ cells. **Human Reproduction Update**. v. 18, n. 1, p. 44–59. 2012. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr0>
- MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, F. D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracellular Vesicles**. v. 3, n. 1, p. 24641. 2014. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- NEYROUD, A. S. et al. Extra-cellular vesicles of the male genital tract: new actors in male fertility?. **Basic Clin. Androl**. v. 31, n. 25. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12610-021-00141-9>
- NILENDU, P. et al. Epididymosomes: A potential male fertility influencer. **Andrologia**. v. 53, n. 9, p. 14155. 2021. <https://doi.org/10.1111/and.14155>
- NIXON, B. et al. The microRNA signature of mouse spermatozoa is substantially modified during epididymal maturation. **Biology of reproduction**. v. 93, n. 4, p. 91. 2015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.132209>
- NIXON, B. et al. Next Generation Sequencing Analysis Reveals Segmental Patterns of microRNA Expression in Mouse Epididymal Epithelial Cells. **PLOS ONE**. v. 10, n. 8, e0135605. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135605>
- PARK, Y. et al. Relative contribution of clear cells and principal cells to luminal pH in the mouse epididymis. **Biology of Reproduction**. v. 96, n. 2, p. 366-375. 2017. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144857>
- PASQUARIELLO, R. et al. Sperm fertilizing ability *in vitro* influences bovine blastocyst miRNA content, **Theriogenology**. v. 222, p. 1 – 9. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.03.016>.

- PĂUNESCU, T. G. et al. High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa, **Molecular Human Reproduction**. v. 20, n. 10, p. 929–937. 2014. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau052>
- PINEL, L.; MANDON, M.; CYR, D. G. Tissue regeneration and the epididymal stem cell. **Andrology**. v. 7, n. 5, p. 618–630. 2019. <https://doi.org/10.1111/andr.12635>
- PIOMBONI, P. et al. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **International Journal of Andrology**. v. 35, n. 2, p. 109–124. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x>
- QUAN, J. et al. Oncogenic miR-425-5p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. **Oncology Letters**. v. 16, p. 2175–2184. 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8948>
- RADTKE, A. et al. Expression of miRNA-371a-3p in seminal plasma and ejaculate is associated with sperm concentration. **Andrology**. v. 7, n. 4, p. 469–474. 2019. <https://doi.org/10.1111/andr.12664>
- RAPOSO, G.; STORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**. v. 200, n. 4, p. 373–383. 2013. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- RINALDI, E. V. D. et al. An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. **eLife** 9. e. 55474. 2020. <https://doi.org/10.7554/eLife.55474>
- RODE, M. P. et al. MiR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer. **Cellular signaling**. v. 87. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110113>
- ROY, J. et al. Tyrosine kinase-mediated axial motility of basal cells revealed by intravital imaging. **Nature Communications**. v. 7, n.1, p. 1–11. 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms10666>
- SELLEM, E. et al. A comprehensive overview of bull sperm-borne small non-coding RNAs and their diversity across breeds. **Epigenetics & Chromatin**. v. 13, n. 19. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00340-0>
- SELLEM, E. et al. Dynamics of cattle sperm snRNAs during maturation, from testis to ejaculated sperm. **Epigenetics & Chromatin**. v. 14, n. 24. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00397-5>
- SHANG, R. et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. **Nature reviews. Genetics**. v. 24, n. 12, p. 816–833. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>
- SHARMA, U., et al. Small RNAs Are Trafficked from the Epididymis to Developing Mammalian Sperm. **Developmental cell**. v. 46, n. 4, p. 481–494. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.023>
- SHARMA, U. Paternal Contributions to Offspring Health: Role of Sperm Small RNAs in Intergenerational Transmission of Epigenetic Information. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 7. 2019. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00215>

- SHI, Y. et al. MiRNAs and Cancer: Key Link in Diagnosis and Therapy. **Genes**. v. 12, n. 8. 2021. <https://doi.org/10.3390/genes12081289>
- SHUM, W. W. et al. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **The Journal of Experimental Biology**. v. 212, n. 11, p. 1753–1761. 2009. <https://doi.org/10.1242/jeb.027284>
- SHUM, W. W. et al. Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. **J Androl**. v. 32, n. 6, p. 576–86. 2011. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012971>
- SKERGET, S. et al. Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. **PLoS ONE**. v. 10, n. 11, e0140650. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140650>
- SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**. v. 146, n. 1, p. 21–35. 2013. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0058>
- SULLIVAN, R.; MIEUSSET, R. The human epididymis: its function in sperm maturation. **Human reproduction update**. v. 22, n. 5, p. 574 – 587. 2016. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
- SULLIVAN R. Epididymosomes: Role of extracellular microvesicles in sperm maturation. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**. v. 8, n. 1, p. 106–114. 2016. <https://doi.org/10.2741/s450>
- TAN, X.H. Extracellular vesicles derived from human Sertoli cells: characterizations, proteomic analysis, and miRNA profiling. **Mol Biol Rep**. v. 49, p. 4673–4681. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07316-1>
- TECLE, E.; GAGNEUX, P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. **Molecular Reproduction and Development**. v. 82, n. 9, p. 635–650. 2015. <https://doi.org/10.1002/mrd.22500>
- VADNAIS, M. L. et al. Signaling in sperm: toward a molecular understanding of the acquisition of sperm motility in the mouse epididymis. **Biology of reproduction**. v. 89, n. 5, p. 127. 2013. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110163>
- WANG, C. et al. High-throughput sequencing reveals differential expression of miRNAs in yak and cattleyak epididymis. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**. v. 57, n. 2, p.125–140. 2022. <https://doi.org/10.1111/rda.13973>
- WANG, B. et al. Sertoli cells-derived exosomal miR-30a-5p regulates ubiquitin E3 ligase Zeb2 to affect the spermatogonial stem cells proliferation and differentiation. **Reproductive Toxicology**. v. 117, e. 108340. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2023.108340>.
- WELSH, J. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**. v. 13, n. 2. 2023. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- WU, C., et al. Study of microRNA Expression Profile in Different Regions of Ram Epididymis. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**. v. 56. n. 9, p. 1209–1219. 2021. <https://doi.org/10.1111/rda.13978>

- WU, C. et al. Sperm miRNAs— potential mediators of bull age and early embryo development. **BMC Genomics**. v. 21, n. 798. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07206-5>
- WU, S. et al. Downregulation of ZC3H13 by miR-362-3p/miR-425-5p is associated with a poor prognosis and adverse outcomes in hepatocellular carcinoma. **Aging**. v. 14, n. 5, p. 2304–2319. 2022. <https://doi.org/10.18632/aging.203939>
- WU, X. et al. Developmental miR-17-92 cluster and sfmbt2 miRNA cluster can't rescue the abnormal embryonic development caused by the obstructive epididymal environment. **Research Square**. 2022, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1814149/v1>
- WU, Y. et al. Association between Yili goose sperm motility and expression profiles of mRNA and miRNA in testis. **BMC Genomics**. v. 24, n. 640. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09727-1>
- WU, Z. et al. MiR-425-5p accelerated the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells via targeting AFF4. **Journal of Ovarian Research**. v. 14, p. 1-11. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00894-x>
- XING, K. et al. Epididymal mRNA and miRNA transcriptome analyses reveal important genes and miRNAs related to sperm motility in roosters. **Poultry Science**. v. 101, p. 101558. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101558>
- XU, H. et al. The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. **Asian journal of andrology**. v. 15, n. 6, p. 799–805. 2013. <https://doi.org/10.1038/aja.2013.69>
- XU, X. et al. Effect of Sperm Cryopreservation on miRNA Expression and Early Embryonic Development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 9, e. 749486. 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.749486>
- YANAGIMACHI, R. et al. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. **The American journal of anatomy**. v. 172, n. 4, p. 317–330. 1985. <https://doi.org/10.1002/aja.1001720406>
- YAN, Y. F. et al. MiR-425-5p promotes tumor progression via modulation of CYLD in gastric cancer. **European review for medical and pharmacological sciences**. v. 21, n. 9, p. 2130–2136. 2017.
- YING, S. Y.; CHANG, D. C.; LIN, S. L. The MicroRNA. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. v. 1733, p. 1–25. 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7601-0_1
- YUAN, S. et al. Proteomic Analyses Reveal a Role of Cytoplasmic Droplets as an Energy Source during Epididymal Sperm Maturation. **PLoS ONE**. v. 8, n. 10, e77466. 2013. <https://doi:10.1371/journal.pone.0077466>
- YUAN, J. 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**. v. 127, p. 339-346. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02134-5>

ZHAO, G. et al. MiRNA profiling of plasma-derived exosomes from dairy cows during gestation. **Theriogenology**. v. 130, p. 89-98. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.001>.

ZHAO, W. et al. Comparative RNA-seq analysis of region-specific miRNA expression in the epididymis of cattleyak. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**. v. 56, n. 4, p. 555–576. 2021. <https://doi.org/10.1111/rda.13893>

ZHANG, G. et al. Extracellular vesicles: Natural liver-accumulating drug delivery vehicles for the treatment of liver diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**. V. 10. 2020. <https://doi.org/10.1002/jev2.12030wileyonlinelibrary.com/journal/jev2>

ZHANG, Y. et al. MicroRNA-425-5p regulates chemoresistance in colorectal cancer cells via regulation of Programmed Cell Death 10. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 20, p. 360-369. 2016. <https://doi:10.1111/jcmm.12742>

ZHANG, Z. et al. Clinical value of miR-425-5p detection and its association with cell proliferation and apoptosis of gastric cancer. **Pathology, research and practice**. v. 213, n. 8, p. 929–937. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.05.009>

ZHOU, H. et al. CCDC28A deficiency causes sperm head defects, reduced sperm motility and male infertility in mice. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 81, p. 174 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05184-5>

ZHOU, W. et al. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. **Frontiers in Endocrinology**. v. 9, e. 341053. 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00059>