

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LUÍSA MARIELLE BORGES DUARTE SILVA

Espermatozoides, complexos cúmulo-oóforo e embriões bovinos em estágio inicial possuem a capacidade intrínseca de ligar e internalizar microRNAs?

Uberlândia

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LUÍSA MARIELLE BORGES DUARTE SILVA

Espermatozoides, complexos cúmulo-oóforo e embriões bovinos em estágio inicial possuem a capacidade intrínseca de ligar e internalizar microRNAs?

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti.

Co-orientadora: Msc. Elusca Helena Muniz.

Uberlândia

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LUÍSA MARIELLE BORGES DUARTE SILVA

Espermatozoides, complexos cúmulo-oóforo e embriões bovinos em estágio inicial possuem a capacidade intrínseca de ligar e internalizar microRNAs?

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 04 de agosto de 2026.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart – Instituto de Biotecnologia – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Lucas Jaeger Kluge – Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter feito infinitamente mais do que sonhei, por me permitir realizar este sonho e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho durante essa jornada.

Agradeço aos meus pais e minhas avós, que lutaram incansavelmente para que eu estivesse aqui. Que me apoiaram nos dias difíceis e me incentivaram durante os 4 anos de graduação longe de casa. Suas orações me fizeram continuar mesmo nos dias em que pensava em desistir. Nada disso seria possível sem a presença e apoio de cada um deles.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, que abriu as portas do laboratório e me recebeu com tanta atenção e dedicação. Que me ensinou e me acompanhou durante toda a minha jornada na área da reprodução animal, sua sabedoria e calma foram essenciais neste processo.

Agradeço a minha coorientadora, Doutoranda Elusca Helena Muniz, que foi também uma amiga e ouvinte durante todos os dias de trabalho. Compartilhar os momentos difíceis e os experimentos tornou essa etapa mais leve, sou imensamente grata por todos os conselhos, ajuda e amizade que levarei sempre comigo.

Aos alunos e equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução, com eles aprendi tudo que hoje sei, e serei sempre grata por compartilharem comigo a rotina, o conhecimento e momentos tão importantes desse processo. Mais que colegas, eles foram companhia e apoio durante todo o período em que estivemos juntos.

Agradeço aos meus amigos da graduação, minha segunda família, que fizeram da Universidade o meu lar. Maria Eduarda, Rafaela, Luiza, Eduardo e Pedro, sem vocês esses 4 anos não teriam sido tão especiais. Obrigada por todos os momentos e fases que compartilhamos juntos, por estarem do primeiro ao último dia ao meu lado. Levarei vocês sempre comigo, em qualquer lugar que estivermos.

Por fim, agradeço minhas amigas, Leandra e Maria Fernanda, e ao meu namorado João Pedro, que foram sempre o meu caminho de volta para casa. Obrigada por me apoiarem e me acompanharem nessa jornada, mesmo que a distância. A presença de vocês trouxe conforto nos dias de cansaço e de saudade.

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) são uma pequena classe de RNAs não codificantes que atuam na regulação pós-transcricional da expressão gênica e desempenham um papel importante em processos reprodutivos, incluindo o desenvolvimento embrionário inicial. Além de sua atuação intracelular, essas moléculas podem ser encontradas em fluidos biológicos e em diversos tecidos do trato reprodutivo, frequentemente associadas a vesículas extracelulares, o que destaca sua capacidade de transporte e de atuação na comunicação celular. O presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a capacidade intrínseca de espermatozoides, complexos cúmulo-oóforo e embriões bovinos em estágio inicial de internalizar moléculas de miRNA. Para isso, foi utilizado o *siRNA Scrambled* marcado com Alexa Fluor 488, que foi suplementado aos meios de maturação, Talp-sperm e de cultivo embrionário. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à análise em microscópio confocal para verificar a internalização das moléculas. Foi possível verificar espermatozoides e células embrionárias com pequenas marcações fluorescentes em seu interior. O mesmo não foi observado nos CCOs. Esses resultados demonstram que espermatozoides e embriões iniciais têm a capacidade de internalizar miRNAs presentes nos meios Talp-sperm e CIV, respectivamente. É importante enfatizar que estes achados devem ser confirmados com experimentos utilizando biologia molecular

Palavras-chave: blastocisto. sêmen. miRNA. transfecção

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are a small class of non-coding RNAs that regulate gene expression post-transcriptionally and play a significant role in reproductive processes, including early embryonic development. Beyond their intracellular activity, these molecules are found in biological fluids and various reproductive tract tissues—often associated with extracellular vesicles—highlighting their capacity for transport and involvement in cell-to-cell communication. This study aimed to evaluate, *in vitro*, the intrinsic capacity of bovine spermatozoa, cumulus-oocyte complexes (COCs), and early-stage embryos to internalize miRNA molecules. To this end, Alexa Fluor 488-labeled Scrambled siRNA was added to the maturation, Talp-sperm, and embryo culture media. Following incubation, samples were analyzed via confocal microscopy to assess molecule internalization. Spermatozoa and embryonic cells displaying small fluorescent signals within them were observed; however, this was not seen in the COCs. These results demonstrate that spermatozoa and early-stage embryos possess the ability to internalize miRNAs present in the Talp-sperm and *in vitro* culture (IVC) media, respectively. It is important to note that these findings require confirmation through molecular biology experiments.

Keywords: blastocyst. semen. miRNA. transfection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVO GERAL.....	11
2.1 Objetivos específicos	11
3. METODOLOGIA.....	12
3.1 Preparação do <i>siRNA Scrambled</i>.....	12
3.2 Obtenção do sêmen.....	12
3.3 Avaliação de espermatozoides	12
3.4 Obtenção e seleção de CCOs.....	12
3.5 Avaliação dos CCOs	13
3.6 Fertilização <i>in vitro</i>	13
3.7 Avaliação dos Zigotos.....	14
3.8 Análise de Embriões	14
4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO.....	18
7. REFERÊNCIAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma das principais biotécnicas de reprodução, que permite a formação do embrião fora do trato reprodutivo da fêmea, por meio de técnicas que unem ovócito e espermatozoide, resultando na obtenção de um embrião viável em laboratório. Seu processo consiste em três etapas principais: maturação, fecundação e cultivo embrionário (Maciel; Masquio; Teixeira, 2025).

Durante a maturação, os ovócitos são mantidos em meio suplementado com hormônios com atividade de FSH e LH, para que, ao final, completem a primeira divisão meiótica e ocorra a expansão do revestimento do cúmulo. Após essa etapa, inicia-se a fertilização *in vitro*, na qual os ovócitos são cocultivados com espermatozoides, previamente separados do sêmen durante a capacitação. Finalmente, os zigotos são encaminhados para o cultivo, onde são mantidos por cerca de 7 dias. Ao final desse período, os embriões são classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e os viáveis são transferidos, de forma simples e não cirúrgica, para o útero de uma vaca receptora (Araújo; Santos, 2025; Maciel; Masquio; Teixeira, 2025).

No Brasil, a PIVE é uma tecnologia consolidada na área da reprodução animal e foi responsável por grande parte do desenvolvimento da pecuária nacional nos últimos anos. Dentre os seus diversos benefícios, destacam-se a redução do intervalo entre gerações, a reprodução de animais em condições adversas e o aumento no número de embriões por fêmea de excelente qualidade genética (Luedke et al., 2019).

Embora suas vantagens sejam expressivas, ainda há diversas limitações nesta biotécnica. As taxas de blastocisto e de prenhez em receptoras de embriões produzidos *in vitro* ainda são aspectos a serem aprimorados. A taxa de blastocisto (porcentagem de ovócitos que se tornaram blastocistos) está em torno de 30% (Wang et al., 2025), e a taxa de prenhez (porcentagem de gestações por blastocistos transplantados) varia entre 35% e 65%, dependendo das condições do processo (Kim et al., 2025). Essas taxas são consideradas relativamente baixas quando comparadas com IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo) que chega a 87,5%, e monta natural, que está em torno de 59% (Santos; Clemente, 2023). Nesse contexto, cresce o interesse pela investigação de mecanismos moleculares que regulam a competência dos gametas e embriões, como é o caso dos microRNAs (miRNAs). Já existem moléculas específicas associadas ao desenvolvimento embrionário inicial satisfatório, como é o caso do bta-miR-425-5p, além de outras caracterizadas como potenciais marcadores de problemas de fertilidade em touros (bta-miR-1246, bta-miR-11975, bta-miR-2285bf, bta-miR-335 e bta-miR-7) (Souza, 2019).

Os miRNAs são uma pequena classe de RNAs não codificantes, com aproximadamente

22 nucleotídeos, que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, por meio da degradação de RNAs mensageiros ou da repressão da tradução de proteínas (Salilew-Wondim et al., 2020). Em animais, os miRNAs atuam predominantemente por meio de um pareamento imperfeito com seu mRNA-alvo, promovendo a inibição da tradução ao interferir no reconhecimento da estrutura 5' CAP e dificultar a montagem do complexo ribossomal. Em alguns casos, também pode ocorrer o pareamento perfeito, levando a desestabilização do mRNA-alvo por meio da atividade *slicer* de algumas proteínas AGO. (Pereira et al., 2015).

Figura 1: Interação entre miRNAs e mRNAs-alvo por pareamento perfeito (a) e pareamento imperfeito (b).



Fonte: Bindra; Wang; Bagga, 2015.

Existem diversas evidências da expressão diferencial de miRNAs em diferentes estágios do desenvolvimento folicular, oocitário e embrionário, bem como de correlação positiva com o desenvolvimento de gametas e embriões. Sua presença já foi confirmada em todos os tecidos reprodutivos e fluidos biológicos, evidenciando seu papel não apenas no desenvolvimento, mas também na gametogênese. Além disso, demonstrou-se que as células do cumulus expressam diferentes miRNAs ao longo do crescimento folicular e da ovulação, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, durante a cultura do complexo cumulus-oócito (Araújo, 2023).

Além da expressão intracelular, os miRNAs também podem ser encontrados fora das células, o que destaca sua capacidade de participar da comunicação intercelular e de serem transportados entre diferentes estruturas biológicas. Sua presença no meio extracelular é frequentemente associada à vesículas extracelulares, que desempenham papel fundamental na comunicação célula-célula no trato reprodutivo (Mazzarella et al., 2024). Dessa forma, espermatozoides podem incorporar miRNAs durante a maturação epididimal por meio das vesículas extracelulares liberadas pelo epitélio do epidídimo. Posteriormente, as moléculas podem ser transferidas ao ovócito durante a fecundação, modulando os futuros processos epigenéticos e o desenvolvimento do embrião (Rojas, 2024).

Apesar do predominante transporte através das vesículas extracelulares, a entrega eficiente de moléculas de miRNA enfrentam desafios técnicos devido à presença de barreiras

biológicas, como a zona pelúcida. Em função disso, diferentes estratégias de transfecção *in vitro*, incluindo a microinjeção, eletroporação, lipofecção e sistemas não-virais, têm sido empregadas para promover a entrada controlada de pequenas moléculas em células reprodutivas e embriões (Grabarek et al., 2002; Hirata et al., 2021; Joo et al., 2014a).

Embora tenham ocorrido avanços significativos nas metodologias, as informações sobre a capacidade intrínseca das células reprodutivas de reconhecer, ligar e internalizar moléculas de miRNA na ausência desses mecanismos ainda são limitadas. Dessa forma, torna-se relevante investigar se tais células como espermatozoides, complexos cúmulo-oóforo (CCOs) e embriões em estágio inicial possuem a capacidade de interagir com essas moléculas de forma espontânea, contribuindo para a compreensão dos processos envolvidos na captação de miRNAs exógenos.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a internalização *in vitro* de moléculas de miRNA por espermatozoides, complexos cúmulo-oóforo e embriões em estágio inicial, a fim de avaliar a capacidade intrínseca destas células de reconhecer, ligar e internalizar tais moléculas, para possíveis futuras aplicações em estudos com miRNAs.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar se os espermatozoides bovinos têm a capacidade de internalizar miRNAs durante incubação em meio Talp-sperm
- Investigar se os complexos cúmulo-oóforo têm a capacidade de internalizar miRNAs durante a maturação ovocitária *in vitro*.
- Investigar se embriões iniciais têm a capacidade de internalizar miRNAs durante o cultivo embrionário *in vitro*.

3. METODOLOGIA

Todo o experimento foi realizado em duplicata.

3.1 Preparação do *siRNA Scrambled*

Para a realização dos ensaios, utilizou-se o *siRNA scrambled* AllStars Neg. siRNA AF 488, um siRNA controle negativo fluorescente marcado com Alexa Fluor 488. O material foi diluído em 200 µl de PBS e aliqotado em 20 amostras de 10 µl. Posteriormente, as amostras foram mantidas a – 80 °C ao abrigo da luz até a sua manipulação. O *siRNA scrambled* AllStars Neg. siRNA AF 488 é constituído por pequenos RNAs não codificantes, entre eles miRNAs miméticos, que não possuem possíveis genes-alvo no genoma bovino.

3.2 Obtenção do sêmen

As amostras de sêmen utilizadas no desenvolvimento da pesquisa foram doadas pela ABS Global Brasil. Durante todo o ensaio foi utilizado o sêmen do Touro Hulk KingBoy (Código 3006) tanto para a avaliação de espermatozoides, quanto para a fertilização *in vitro*.

3.3 Avaliação de espermatozoides

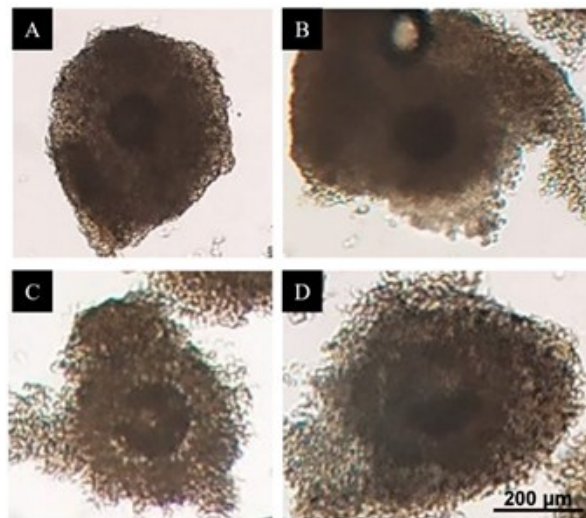
Foram descongeladas duas palhetas de sêmen em banho maria aquecido à 37 °C por 30 segundos. O conteúdo foi lavado com PBS por três vezes, através de centrifugação, durante 5 minutos a 100 × g. Em seguida, foi descongelada uma alíquota de siRNA scrambled e retirados 5 µl para serem diluídos em 0,5 mL de meio Talp-sperm (Vitrogen). Os espermatozoides foram colocados no meio Talp-sperm suplementado (1 nM) após a última lavagem e incubados em estufa a uma temperatura de 37 °C e 5% de CO₂, por um período de 22 a 24h. Após o período de incubação, os espermatozoides foram novamente lavados três vezes em PBS puro e transferidos para uma lamínula contendo uma gota de meio Talp-sperm puro. A avaliação foi realizada em microscópio confocal Zeiss LSM 710, com excitação a 488 nm e emissão entre 516 e 517 nm.

3.4 Obtenção e seleção de CCOs

Para a obtenção dos complexos cúmulo-oóforo, foram utilizados ovários coletados *pos mortem* doados por abatedouro comercial da cidade de Uberlândia (MG). Os ovários foram transportados em uma garrafa térmica até o Laboratório de Biologia da Reprodução na Universidade Federal de Uberlândia. Os ovários foram mantidos em banho-maria a 37 °C para a aspiração folicular, utilizando seringas de 5 mL e agulhas de 18G. O fluido aspirado foi

transferido para tubos Falcon de 50 ml e mantido no banho-maria por 20 minutos para sedimentação das células. Em seguida, o fluido folicular foi depositado em placas de Petri para o rastreamento dos complexos cumúlo-oóforo (CCOs). Por último, foram selecionados os CCOs que apresentavam grau I ou grau II (Figura 2), e transferidos para o meio de maturação *in vitro* por um período de 20 a 24 horas (Araújo, 2026).

Figura 2: CCOs classificados como Grau I (A e B) e Grau II (C e D), segundo a metodologia de Stojkovic (2001)



Fonte: Martins, 2025

3.5 Avaliação dos CCOs

O restante da alíquota de 5 µl de *siRNA scrambled* utilizada no ensaio com espermatozoides foi diluído em 0,5 mL de meio MIV (Vitrogen). O meio suplementado (1 nM) foi utilizado durante a maturação *in vitro* (MIV). Para a MIV, os CCOs selecionados foram lavados três vezes em meio de lavagem (Vitrogen) e transferidos para uma placa de Petri contendo uma gota de 500 µl de meio MIV com *siRNA scrambled* (1 nM) e outras 2 gotas de meio MIV puro, cobertas por 4 mL de óleo mineral. A placa foi mantida em estufa a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂ durante o período de 22 horas. Ao final do período de maturação (22h) os CCOs da gota suplementada foram lavados três vezes em meio MIV puro e transferidos para a lamínula contendo uma gota de meio MIV, a fim de serem observados no microscópio confocal.

3.6 Fertilização *in vitro*

Os CCOs maturados das duas gotas restantes, foram lavados três vezes em meio FIV (Vitrogen) e transferidos para duas gotas de 100 µl de meio FIV puro, cobertas com 4 mL de

óleo mineral. Ao início da fertilização *in vitro*, foi realizada a montagem do mini gradiente de Percoll (Araújo, 2026). Em seguida, uma palheta de sêmen (Touro Hulk KingBoy 3006) foi retirada do galão de armazenamento e descongelada em banho-maria à 37 °C por 30 segundos, o conteúdo foi depositado sobre a superfície do mini gradiente preparado. O material foi centrifugado e preparado conforme descrito por Araújo (2026) para avaliação da motilidade e contagem de espermatozoides. Ao final das análises, foram realizados os cálculos para obtenção da concentração espermática e do volume a ser pipetado em cada uma das gotas, seguindo o critério de 10.000 espermatozoides por ovócito (Araújo, 2026). Por fim, as gotas foram fecundadas e mantidas novamente em estufa a uma temperatura de 37 °C e 5% de CO₂, por um período de 19 horas.

3.7 Avaliação dos Zigotos

Outra alíquota de 10 µl do *siRNA scrambled* foi descongelada e diluída em 1,0 mL de meio CIV (Vitrogen), dessa solução foram utilizados 0,5 mL durante o cultivo dos zigotos. Após o período de fecundação, os zigotos foram desnudados de forma mecânica por pipetagem e lavados três vezes em meio CIV puro (Vitrogen). Em seguida, foram transferidos sem as células do cúmulo para uma placa contendo, uma gota de 0,5 mL de meio CIV com *siRNA scrambled* (1 nM) e uma gota de 0,5 mL de meio CIV puro, cobertas por 4 mL de óleo mineral. Após 24 horas, os zigotos da gota suplementada em início de clivagem foram transferidos para uma lamínula contendo uma gota de meio CIV e avaliados em microscópio confocal. O restante da solução de meio CIV com *siRNA Scrambled* (0,5 mL) foi congelado para ser utilizado no ensaio seguinte.

3.8 Análise de Embriões

Os embriões da gota restante foram mantidos em meio CIV puro durante 3 dias. Após esse período, o meio foi substituído por 0,5 mL de meio com *siRNA scrambled* (1 nM) restantes do último experimento. Esses embriões foram mantidos por mais 24 horas em meio suplementado e em seguida lavados três vezes com meio CIV puro. Em seguida, foram transferidos para uma lamínula contendo uma gota de meio CIV e observados em microscópio confocal.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos não foram semelhantes entre as duas repetições. Os espermatozoides e embriões com dois e cinco dias de cultivo apresentaram, em pelo menos uma das preparações, células fluorescentes. Já os CCOs não apareceram marcados em nenhuma das repetições. A figura 1 mostra imagens obtidas em microscópio confocal dos espermatozoides (A), CCOs (B) e embriões com dois (C) e cinco dias (D) de cultivos.

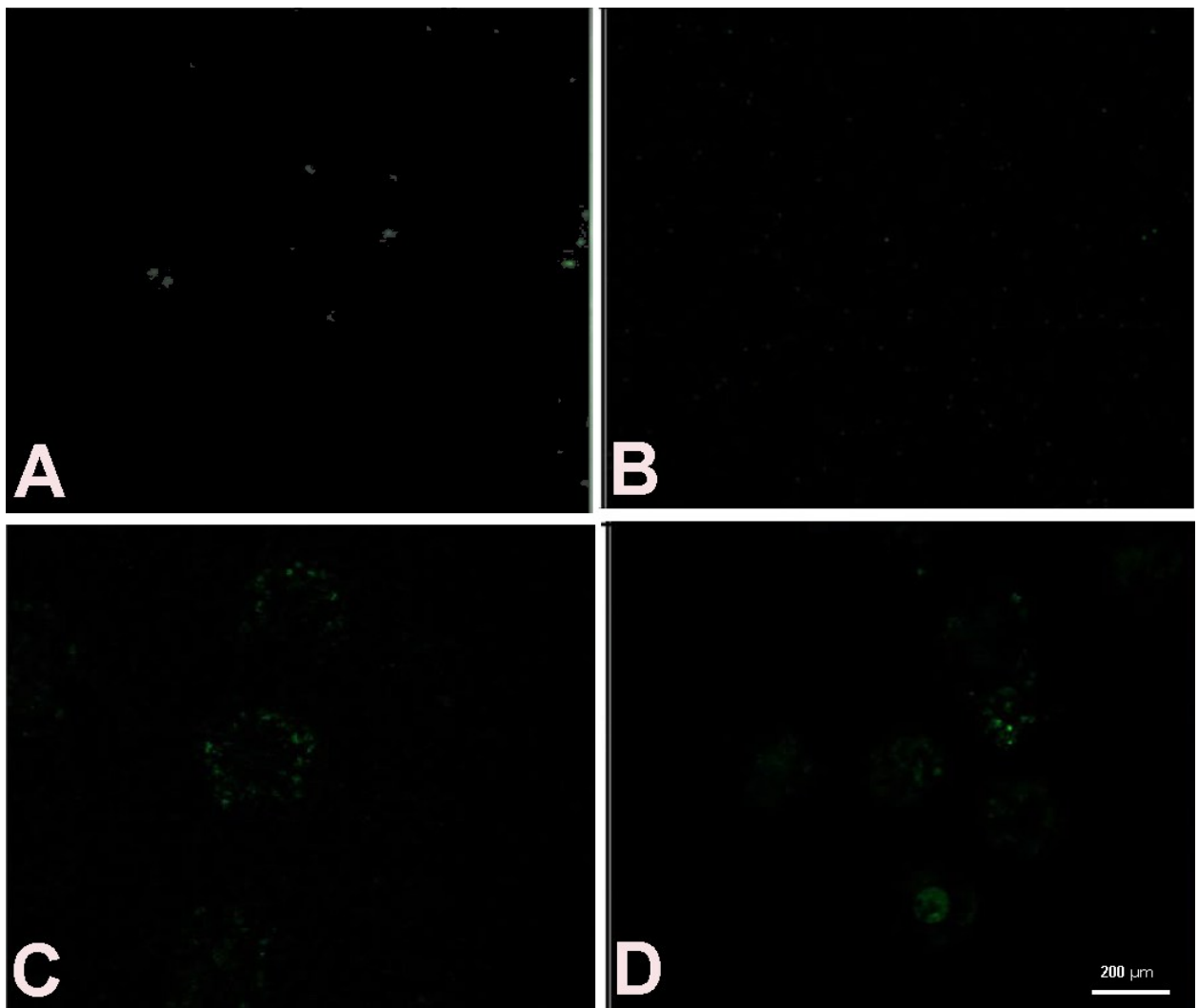


Figura 1: Imagens em microscopia confocal que mostram: imagem com pequenos pontos fluorescentes de cor verde no preparado com espermatozoides (A); imagem sem fluorescência de COCs (B); imagens de embriões com dois (C) e cinco dias (D) de cultivo, com pequenas marcações de cor verde fluorescente.

5. DISCUSSÃO

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica pós-transcricional por pareamento com mRNAs-alvo. Na biologia da reprodução, os miRNAs emergem como moléculas-chave na regulação da espermatogênese, da maturação ovocitária, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial. A transfecção *in vitro* de miRNAs — seja na forma de mimics (análogos sintéticos que mimetizam miRNAs endógenos) ou de inibidores (anti-miRs, antagonistas) — constitui uma ferramenta essencial para estudos funcionais e para potenciais aplicações biotecnológicas. Contudo, cada sistema celular impõe desafios particulares de entrega, viabilidade e eficiência (Reza et al., 2019).

No presente trabalho foi utilizado siRNA scrambled marcado com Alexa Fluor 488 para testar se espermatozoides, CCOs e embriões bovinos em estágio inicial possuem a capacidade intrínseca de internalizar miRNAs. Para isso, espermatozoides, CCOs, zigotos e embriões com três dias de cultivo foram incubados em meios suplementados com 1 nM deste produto. Este siRNA scrambled é constituído por pequenos RNAs não codificantes, entre eles miRNAs miméticos, que não possuem possíveis genes-alvo no genoma bovino. Após a incubação (22 a 24h), todas as estruturas foram observadas em microscópio confocal. Com exceção dos CCOs, os espermatozoides, zigotos e embriões apresentaram pequenas marcações fluorescentes em seu interior, o que, teoricamente, indica que os siRNAs foram de alguma forma incorporados.

Espermatozoides são células altamente diferenciadas, com citoplasma reduzido, cromatina compactada e transcricionalmente silenciosas. Durante décadas, acreditou-se que seu papel se restringia à entrega do genoma paterno. No entanto, evidências acumuladas demonstram que espermatozoides carregam um repertório complexo de pequenos RNAs não codificantes (sncRNAs), incluindo miRNAs, piRNAs e tsRNAs (tRNA-derived small RNAs), adquiridos durante o trânsito epididimário e essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial (Conine et al., 2018; Sharma et al., 2018). Essas moléculas são transferidas para o oócito na fertilização e modulam a expressão gênica embrionária pré-implantação. Portanto, os espermatozoides podem ser utilizados como vetores de transfecção de miRNAs para o ovócito. A transfecção de miRNAs em espermatozoides enfrenta barreiras significativas: compactação da cromatina, mínimo volume citoplasmático e alta sensibilidade da membrana plasmática. Os principais métodos incluem: eletroporação capilar (Gonçalves et al., 2026), dendrímeros catiônicos (Gonçalves et al., 2026), compostos orgânicos (VisuFect) (Joo et al., 2014b) e vesículas extracelulares (EVs) (Fereshteh et al., 2018). Baseado nos trabalhos que já testaram a transfecção de miRNAs em espermatozoides utilizando estas metodologias de transfecção, percebe-se que elas são viáveis, porém com eficiência limitada (tipicamente 10–30% das células). As principais limitações incluem: (i)

redução da motilidade pós-transfecção, especialmente com eletroporação; (ii) ausência de maquinaria transcricional endógena, o que restringe a ação dos miRNAs ao período pós-fertilização; (iii) dificuldade em distinguir efeitos diretos dos miRNAs transferidos de efeitos indiretos sobre a viabilidade espermática. O presente trabalho testou uma alternativa de incorporação (transfecção) de miRNAs, que, teoricamente, pouco ou nada influenciaria as funções espermáticas. Como nem todos os espermatozoides apresentaram fluorescência após a incubação com siRNA scrambled, deduz-se que a metodologia utilizada também tem eficiência limitada.

O complexo cúmulo-oócito (COC) é uma unidade funcional em que as células do cúmulo e o oócito comunicam-se bidirecionalmente por meio de junções gap e projeções transzonais. Evidências recentes indicam que miRNAs são transferidos entre esses compartimentos e que essa comunicação é essencial para a aquisição de competência ovocitária e para a maturação nuclear e citoplasmática. O estudo de (2024) demonstrou, pela primeira vez, que miRNAs atravessam as junções gap no COC bovino: o mimico de bta-miR-21-5p marcado com FAM foi visualizado no interior do oócito após a incubação do COC intacto, e o bloqueio das junções gap com carbenoxolona reduziu significativamente a transferência.

Os principais meios de transfecção em CCOs já testados são: transferência via junções gap (Six et al., 2024), vesículas extracelulares (EVs) de células do cúmulo (Fiorentino et al., 2024), microinjeção citoplasmática (Six et al., 2024) e transfecção com lipofectamina (Han et al., 2021). Todas mostraram-se viáveis; no entanto, a abordagem de transferência gap-juncional é promissora por ser não invasiva, mas depende da integridade do COC e da presença de junções gap funcionais, o que limita o período de janela experimental (nas primeiras horas de MIV). A entrega via EVs é biologicamente relevante, porém o carregamento específico de miRNAs em EVs ainda é tecnicamente desafiador. A microinjeção, embora precisa, é trabalhosa e de baixo rendimento. Na tentativa de obter um método eficiente e simples para a transfecção de CCOs, no presente trabalho, testou-se a suplementação do meio MIV com 1 nM de siRNA scrambled. Nenhuma das estruturas avaliadas por microscopia confocal apresentou sinais de fluorescência. Portanto, a metodologia testada não se mostrou viável para transfecção de miRNA em CCOs. Esse resultado pode ser visto possivelmente devido à dificuldade dos miRNAs em ultrapassar a barreira das células do cúmulos, já que, para que a transferência via junções gap ocorra, as moléculas precisam antes estar dentro das células. Além disso, o meio MIV utilizado durante o processo de maturação das CCOs é um dos mais complexos da rotina de produção *in vitro*, rico em proteínas, vitaminas, sais minerais e alguns hormônios (FSH e LH). Dessa forma, a complexidade do meio pode, de certa forma, ter influenciado a internalização do miRNAs ou até mesmo provocado a degradação das moléculas. Existe também a diferença entre repetições, que se dá pela diferença de amostra, já que as CCOs aspiradas em cada rotina não são padronizadas acerca da origem e desempenho da doadora.

Embriões pré-implantacionais passam por ativação do genoma embrionário (EGA) em estágio espécie-específico (2-4 células em camundongos, 8-16 células em bovinos, 4-8 células em humanos). Durante esse período, o desenvolvimento depende de transcritos e RNAs maternos armazenados no oócito, e os miRNAs desempenham um papel crucial na eliminação desses transcritos e na ativação da transcrição embrionária. A transfecção de miRNAs em embriões iniciais permite investigar a função gênica durante o desenvolvimento pré-implantação (Six et al., 2024). Os principais métodos de transfecção de miRNA em embriões iniciais já testados são: microinjeção em zigotos (Joo et al., 2014b), eletroporação (Hakim et al., 2021), sistema VisuFect (VFA) (Joo et al., 2014a), lipofecção (Hakim et al., 2021) e vetores virais (Mishima et al., 2016). A microinjeção continua sendo o método mais confiável, com eficiência de entrega próxima de 100%, mas com viabilidade reduzida (70-85% dos zigotos sobrevivem). O sistema VisuFect representa um avanço significativo por ser livre de microinjeção e aplicável a múltiplas espécies, mas sua eficiência de entrega é inferior à microinjeção. A principal limitação técnica é a zona pelúcida, que bloqueia a maioria dos vetores não virais. Além disso, a toxicidade de alguns reagentes de transfecção (lipofectamina, polímeros catiônicos) é uma preocupação para embriões, que são particularmente sensíveis ao estresse químico. Com base nisso, o presente trabalho testou a suplementação do meio CIV com miRNA como um método mais simples para a transfecção de zigotos e embriões com três dias de cultivo. Para isso, foi utilizada a suplementação a 1 nM de siRNA scrambled marcado com Alexa Fluor 488, com posterior avaliação em microscopia confocal. A observação de células com pequenas marcações fluorescentes no citoplasma indica a internalização de siRNAs. Portanto, o método testado pode ser uma alternativa à transfecção *in vitro* de miRNAs em zigotos e embriões pré-implantacionais.

É importante enfatizar que a simples observação, ou não, de fluorescência nas células incubadas com siRNAs scrambled marcados com Alexa Fluor 488 é apenas um indício de que ocorreu transfecção. Portanto, fazem-se necessários novos trabalhos utilizando biologia molecular para confirmar a transfecção e a viabilidade dos métodos ora testados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que espermatozoides e embriões iniciais têm a capacidade de internalizar miRNAs presentes nos meios Talp-sperm e CIV, respectivamente. Isso não foi observado em CCOs maturados em meio MIV contendo miRNAs. É importante enfatizar que estes achados devem ser confirmados por meio de experimentos de biologia molecular, além da padronização e maior número de repetições.

7. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, Dayana Silva; SANTOS, Rafael Monteiro dos. EVENTOS FISIOLÓGICOS E ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS - REVISÃO. **Sinapse Múltipla**, v. 14, n. 1, p. 259–275, 15 jul. 2025.
- ARAÚJO, Thaís de. Perfil de expressão de transcritos e de microRNAs no desenvolvimento da competência de oócitos de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*). 24 fev. 2023.
- ARAÚJO, Victor Henrique. Método de maturação ovocitária e cultivo embrionário bovino sob agitação 3D (por inclinação) lenta. 20 mar. 2026.
- BINDRA, Richipal Singh; WANG, Jason T. L.; BAGGA, Paramjeet Singh. BIOINFORMATICS METHODS FOR STUDYING MICRORNA AND ARE-MEDIATED REGULATION OF POST-TRANSCRIPTIONAL GENE EXPRESSION. *International Journal of Knowledge Discovery in Bioinformatics*, v. 1, n. 3, p. 97–112, jul. 2010.
- CONINE, Colin C. *et al.* Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice. **Developmental Cell**, v. 46, n. 4, p. 470–480.e3, ago. 2018.
- FERESHTEH, Zeinab *et al.* Murine Oviductosomes (OVS) microRNA profiling during the estrous cycle: Delivery of OVS-borne microRNAs to sperm where miR-34c-5p localizes at the centrosome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16094, 31 out. 2018.
- FIORENTINO, Giulia *et al.* Extracellular vesicles secreted by cumulus cells contain microRNAs that are potential regulatory factors of mouse oocyte developmental competence. **Molecular Human Reproduction**, v. 30, n. 6, p. gaee019, 30 maio 2024.
- GONÇALVES, Laís dos Santos *et al.* First Report of CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Delivery Into Teleost Spermatozoa With Preserved Membrane and Genomic Integrity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 93, n. 5, p. e70114, 2026.
- GRABAREK, Joanna B. *et al.* Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. **Genesis**, v. 32, n. 4, p. 269–276, 2002.
- HAKIM, Bilal Ahmad *et al.* Electroporation of Mouse Follicles, Oocytes and Embryos without Manipulating Zona Pellucida. **Journal of Developmental Biology**, v. 9, n. 2, p. 13, jun. 2021.
- HAN, Xiao *et al.* Expression profiling and function analysis identified new microRNAs regulating cumulus expansion and apoptosis in cumulus cells. **Molecular Human Reproduction**, p. gaab070, 17 dez. 2021.
- HIRATA, Maki *et al.* Generation of mutant pigs by lipofection-mediated genome editing in embryos. **Scientific Reports**, v. 11, p. 23806, 13 dez. 2021.
- JOO, Jin Young *et al.* Microinjection free delivery of miRNA inhibitor into zygotes. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5417, 24 jun. 2014a.
- JOO, Jin Young *et al.* Microinjection free delivery of miRNA inhibitor into zygotes. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 5417, 24 jun. 2014b.
- KIM, Tae-Gyun *et al.* Increased apoptosis in late-developing in vitro fertilized bovine blastocysts decreases successful pregnancy. **Animal Bioscience**, v. 38, n. 3, p. 454–465, 1 mar. 2025.
- LUEDKE, Felipe Eduardo *et al.* Aspectos da produção in vitro de embriões bovinos no Brasil – revisão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 1/2, p. 120–132, 1 out. 2019.
- MACIEL, Kézia Coelho; MASQUIO, Jaqueline Assini; TEIXEIRA, Mayra Meneguelli. Produção in

vitro de embriões bovinos: Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 14, n. 6, p. e6314649073, 17 jun. 2025.

MARTINS, M. C. Avaliação da suplementação do meio de maturação in vitro de ovócitos bovinos com beta-NGF. 2025. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2025.

MAZZARELLA, Rosane *et al.* Extracellular vesicles: emerging paradigms in bovine embryo-maternal communication. **Animal Reproduction**, v. 21, p. e20240065, 2024.

MISHIMA, Takuya *et al.* Determinants of effective lentivirus-driven microRNA expression in vivo. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33345, 15 set. 2016.

PEREIRA, Tiago Campos *et al.* Mecanismos de ação de microRNAs. **Introdução ao mundo dos microRNAs**, 2015.

REZA, Abu Musa Md Talimur *et al.* Roles of microRNAs in mammalian reproduction: from the commitment of germ cells to peri-implantation embryos. **Biological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 415–438, 2019.

ROJAS, Yulizabeth. **O microRNA bta-miR-425-5p adquirido pelo espermatozoide durante o processo de maturação no epidídimo**. [S.l.]: Universidade Federal de Uberlândia, 4 set. 2024.

SALILEW-WONDIM, Dessie *et al.* The Role of MicroRNAs in Mammalian Fertility: From Gametogenesis to Embryo Implantation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 585, jan. 2020.

SANTOS, Gabriel Cordeiro; CLEMENTE, Mateus Aparecido. AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA TAXA DE PREENHEZ EM VACAS MESTIÇAS SUBMETIDAS À MONTA NATURAL E A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO NO MUNICÍPIO DE ESPIGÃO D'OESTE –RO. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 10, p. 5942–5949, 31 out. 2023.

SHARMA, Upasna *et al.* Small RNAs Are Trafficked from the Epididymis to Developing Mammalian Sperm. **Developmental Cell**, v. 46, n. 4, p. 481- 494.e6, ago. 2018.

SIX, R. *et al.* Expression profile and gap-junctional transfer of microRNAs in the bovine cumulus-oocyte complex. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 12, 11 jul. 2024.

SOUZA, Gabriel. **MICRO-RNAs ESPERMÁTICOS CORRELACIONADOS COM A FERTILIZAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES BOVINOS (Bostaurus) IN VITRO**. [S.l.: S.n.].

WANG, Lin *et al.* Oviduct-derived C-type natriuretic peptide improves bovine preimplantation embryo development in vitro by attenuating oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 240, p. 124–138, dez. 2025.