MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES

**Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação
com a fertilidade**

São Paulo

2018

MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES

**Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação
com a fertilidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

De acordo: _____
Orientadora

São Paulo
2018

Obs.: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3701
FMVZ

Alves, Maíra Bianchi Rodrigues
Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação com a fertilidade / Maíra Bianchi Rodrigues Alves. – 2018.
172 f. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Espermatozoides. 2. ncRNAs. 3. miRNAs. 4. Exossomos. 5. Estresse térmico. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação com a fertilidade", protocolado sob o CEUA nº 1912050516, sob a responsabilidade de **Enelva Carla Carvalho Celeghini** e equipe; **Maíra Bianchi Rodrigues Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/06/2016.

We certify that the proposal "Profile of microRNAs present in semen and embryos and their relationship to fertility", utilizing 12 Bovines (12 males), protocol number CEUA 1912050516, under the responsibility of **Enelva Carla Carvalho Celeghini** and team; **Maíra Bianchi Rodrigues Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/01/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2016 a 02/2017**

Área: **Reprodução Animal**

Procedência: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: Bovinos	sexo: Machos	Idade: 24 a 36 meses	N: 6
Linhagem: Angus		Peso: 400 a 900 kg	

Procedência: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: Bovinos	sexo: Machos	Idade: 24 a 40 meses	N: 6
Linhagem: Nelore		Peso: 400 a 600 kg	

Resumo: O sêmen bovino, fluido corporal sujeito a mudanças ambientais, que podem alterar sua qualidade e influenciar as taxas de sobrevivência dos espermatozoides, apresenta diversas moléculas ainda não descritas. Dentre elas estão os microRNAs, reconhecidos como fundamentais para a fecundação e desenvolvimento embrionário inicial. Entretanto, existem poucos estudos relacionando o perfil dos microRNAs seminais e a fertilidade em bovinos. Portanto, nossa hipótese é que microRNAs presentes no sêmen estão associados à fertilidade. Para isso, o estudo pretende investigar os microRNAs presentes em espermatozoides, e relacioná-los com o desenvolvimento embrionário in vitro e in vivo, e com os índices de fertilidade a campo. Dois experimentos serão executados. O primeiro experimento avaliará a qualidade espermática e o perfil de microRNAs espermáticos. Para isso, serão utilizadas palhetas comerciais de 6 touros com diferentes taxas de fertilidade verificadas previamente a campo. Para cada touro, 3 partidas serão avaliadas (n=18). As palhetas serão descongeladas e avaliadas da cinética espermática, integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e do perfil de microRNAs dos espermatozoides serão realizadas. No experimento 2 será realizada a produção in vitro de embriões. Os dados obtidos (taxa de blastocisto, qualidade embrionária e perfil de microRNAs dos embriões) serão comparados entre os grupos determinados no experimento 1. Os dados dos diferentes grupos definidos pelo experimento 1 serão submetidos à análise de variância e teste de Tukey com nível de significância de 5%. Espera-se encontrar microRNAs associados com a fertilidade. Resultados desse projeto servirão para criar novas ferramentas de análise de ejaculados bovinos.

Local do experimento: Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 27 de julho de 2016

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Maíra Bianchi Rodrigues

Título: Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação com a fertilidade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico esta tese a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Dedico à minha família espalhada por Ribeirão, Peruíbe e Pirassununga.

Dedico ao Tiago, por todo apoio, paciência e carinho.

Dedico à minha avó (*in memoriam*).

E, principalmente, dedico à minha mãe, que sempre me incentivou e me apoiou. Que sempre colocou minhas prioridades à frente das dela. E que, sempre me mostrou, desde pequena, que o conhecimento é o maior bem que podemos ter.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Eneida Carla Carvalho Celeghini pelos ensinamentos, confiança, orientação e dedicação. Agradeço muito por ter permitido que fizéssemos colaborações e parcerias que resultassem neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda pelos ensinamentos, confiança e dedicação. Agradeço muito por ter aprendido com o senhor sobre a Andrologia e sobre a complexidade dessa Ciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Felipe Perecin e ao Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira pelos ensinamentos, confiança e dedicação. Agradeço à oportunidade de ter feito a disciplina “Aspectos Celulares e Moleculares da Biologia do Desenvolvimento” e ter aprendido tantos assuntos novos que me mostraram outros caminhos. Agradeço pela oportunidade em trabalhar no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento.

Agradeço ao Dr. Manoel Francisco de Sá Filho pela dedicação, parceria e amizade, e à Empresa Alta Genetecis pela parceria e fornecimento das partidas de sêmen utilizadas para o desenvolvimento desta tese.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, ao Prof. Mario Binelli e ao Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla pelos ensinamentos, conversas e discussões que levaram ao enriquecimento do trabalho e ao meu crescimento profissional. Agradeço também ao Prof. Dr. Flávio Meirelles pela oportunidade em trabalharmos em parceria no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento. Agradeço também ao Prof. Dr. Mario Binelli pelos ensinamentos durante o período em que participei, como representante discente, da comissão do Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal.

Agradeço ao Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade pelos ensinamentos durante o período em que fui representante discente, pelas conversas e por ter permitido a utilização do Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos para grande parte das análises aqui realizadas. Agradeço às pós-graduandas Mariana Andrade, Sisele Moura e Marina Passarelli por sempre atenderem prontamente aos meus pedidos para utilizar o laboratório.

Agradeço aos professores do Departamento de Reprodução Animal, Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade, Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi, Profa. Dra. Camila Infantes Vannucchi, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, Prof. Dr. Ed Koffmann Madureira, Profa. Dra. Eneida Carla Carvalho Celeghini, Prof. Dr. Guilherme Pugliesi, Prof. Dr. José Antonio Visintin, Prof. Dr. Marcilio Nichi, Prof. Dr. Mario Binelli, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira e Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda por todos os ensinamentos durante as disciplinas de graduação e pós-graduação. Agradeço à Profa. Dra. Mayra Assumpção e ao Prof. Dr. Visintin por ter permitido que já no primeiro ano de faculdade eu acompanhasse a rotina do laboratório, sou muito grata. Agradeço ao Prof. Dr. Mario Binelli e ao Prof. Dr. Claudio Alvarenga por ter nos ensinado tanto sobre o mundo dos hormônios e da fisiologia reprodutiva. Agradeço ao Prof. Dr. Pietro Baruselli, ao Prof. Dr. Ed Koffmann e ao Prof. Dr. Visintin pelas magníficas aulas de manejo reprodutivo que me deram certeza da área que gostaria de seguir. Agradeço à Profa. Mayra Assumpção, à Profa. Camila Vannucchi, à Profa. Dra. Valquiria Kyppolito Barnabé, à Profa. Dra. Carla Celeghini e ao Prof. Dr. Rubens Arruda pelas aulas maravilhosas de Andrologia e Biotecnologia da Reprodução. Agradeço à Profa. Kiky, à Profa. Claudia Fernandes e à Profa. Dra. Clair pelas aulas inspiradoras de Obstetrícia. Agradeço ao Prof. Dr.

André, ao Prof. Dr. Guilherme Pugliesi, ao Prof. Dr. Marcílio e ao Prof. Dr. Ricardo que apesar de não ter tido a oportunidade de ter o convívio durante a graduação, pude ter tido contato durante a pós-graduação. Agradeço muito pelo convívio e ensinamentos.

Agradeço à Profa. Dra. Clémence Belleannée e Prof. Dr. Robert Sullivan pelos ensinamentos e confiança durante o período em que estive na “Université Laval”. Agradeço ao Dr. Christian Roy pelos ensinamentos na área molecular. Agradeço à Agathe Bernet, à Christine Légaré, ao Hong Chen, à Olivia Jerczynski e à Larissa Belardin pelos ensinamentos e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Chiaratti, à pós-graduanda Karen Carvalho e à Dra. Angela Gonella-Díaz por terem contribuído prontamente com materiais necessários para a realização desta tese.

Agradeço à Dra. Shirley Florez-Rodriguez, à Dra. Bruna Oliveira e à Dra. Luiza Carneiro, aos pós-graduandos Leonardo Batissaco, Sâmara Costa, Vinícius Nogueira, Vitor Hugo Gonzaga, Nataly Garcia Oliveros, Flávia Almeida e à aluna de iniciação Laís Gomes do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução por toda a colaboração, troca de experiências e amizade.

Agradeço à Renata Lançoni, Milena Oliveira, Vanessa Storillo, grandes amigas queridas desses anos, e todos os pós-graduandos do Centro de Reprodução Animal de Pirassununga, Moana, Thiago Santin, Angela, Roney, Kleber, Milton, Fabian, Felipe, Mari Sponchi e Tiago Martins por toda a convivência, colaboração e amizade.

Agradeço ao Dr. Tiago Henrique Camara De Bem, à Dra. Gabriella Andrade, à Dra. Maite Del Colado, ao Dr. Giuliano Sangalli e ao Dr. Rafael Sampaio e aos pós-graduandos Ana Clara de Ávila, Alessandra Bridi e Ramon Botigelli do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, por todos os ensinamentos, colaborações e trocas de experiência. Agradeço também aos pós-graduandos Fernanda Cavallari, Marina Lima, Manalisa Bomfim, Carolina Nogueira, Leticia Schefer, Daniela Paschoal, Raquel Castro e Hugo Fernandes por toda a ajuda, convívio e amizade.

Agradeço especialmente ao Dr. Tiago Henrique Camara De Bem pela colaboração na realização desta tese e por toda a dedicação, ensinamentos e amizade. Grande exemplo de profissional e de pessoa; tenho certeza que chegará longe.

Agradeço aos funcionários Sr. Clayton Costa e Sra. Karumi por toda a ajuda e disposição em colaborar.

Agradeço a todos amigos e familiares pelo imenso apoio e suporte. Agradeço à Deus que me dá a oportunidade a cada dia de me renovar e me tornar um ser humano melhor. Espero continuar aprendendo mais a cada dia.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade em realizar este doutorado.

Por fim, agradeço à Capes pela bolsa de estudos do período de 01/10/2014 a 31/12/2015 e à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro por meio da concessão da bolsa de doutorado no Brasil (Processo Fapesp 2015/09154-6), da bolsa de doutorado no exterior (Processo Fapesp 2016/23243-4) e do auxílio à pesquisa deste projeto (Processo Fapesp 2016/05395-1).

“Não existem métodos fáceis para resolver problemas difíceis”

René Descartes

RESUMO

ALVES, M.B.R. **Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação com a fertilidade** [Profile of microRNAs present in semen and embryos and their relationship to fertility]. 2018. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Dentre outros fatores, a fertilidade depende da qualidade espermática (QE; características morfofuncionais) e dos componentes espermáticos moleculares. Devido à QE nem sempre estar associada à fertilidade, o estudo dos componentes moleculares ganha cada vez mais destaque. Os microRNAs, reguladores pós-transcricionais, estão presentes nos espermatozoides e desempenham funções importantes na espermatogênese, na maturação espermática e no desenvolvimento embrionário. Entretanto, os mecanismos pelos quais estes regulam a fertilidade masculina são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo dos estudos aqui presentes foi investigar o papel dos miRNAs na determinação e regulação da fertilidade. No primeiro estudo, partidas de sêmen criopreservado de touros Aberdeen Angus (*Bos taurus*) com alta ($54,3 \pm 1,0\%$; AF; $n=3$) e baixa fertilidade ($41,5 \pm 2,3\%$; BF; $n=3$) foram submetidas às avaliações da QE; à produção *in vitro* e coleta de embriões com uma célula, duas células e blastocistos; e à avaliação do perfil de 380 miRNAs. Os genes-alvo dos miRNAs diferentemente abundantes nos espermatozoides e nos embriões dos touros AF e BF foram investigados. O diâmetro, número de células e taxa de proliferação dos blastocistos também foram analisados. Ainda, neste estudo, foi validado um novo modelo para provar que o espermatozoide é capaz de entregar miRNAs ao embrião. Para a análise estatística, foram empregadas as análises de variância (ANOVA) e de Qui-Quadrado. Quando não mencionado, o nível de significância foi de 5%. Dentre os miRNAs avaliados, o miR-216b foi menos abundante nos espermatozoides ($P=0,08$) e zigotos ($P<0,05$) dos touros AF. O gene-alvo deste miRNA, KRAS, associado à proliferação celular, foi mais abundante ($P<0,05$) nos embriões de duas células dos touros AF assim como a taxa de primeira clivagem e o número de células dos blastocistos que foram maiores neste grupo. Ainda, provou-se que o miR-216b é entregue pelo espermatozoide ao embrião. No segundo estudo, seis touros da raça Nelore (*Bos indicus*) foram utilizados, sendo três submetidos ao estresse térmico testicular (*heat stress*; HS). O sêmen foi coletado sete dias antes e 21 dias após o estresse. A QE foi avaliada seguida pela análise do perfil de 380 miRNAs espermáticos e exossomais. Os dados foram analisados por ANOVA. O nível de significância foi de 5%. HS apresentou 21 miRNAs espermáticos diferentemente abundantes, mas não apresentou diferença

no conteúdo de miRNAs exossomais. Os miR-126-5p e -146a apresentaram menor abundância nos espermatozoides HS assim como apresentaram menor abundância nos espermatozoides dos touros BF do primeiro estudo. Já o miR-216b não apresentou diferença neste segundo estudo. Assim, com base nos dois estudos, podemos concluir que 1) os miRNAs são importantes para a fertilidade; 2) existem miRNAs importantes para a fertilidade que são alterados por injúrias à espermatogênese; e 3) o miR-216b, entregue pelo espermatozoide ao embrião, é importante para o desenvolvimento embrionário inicial regulando de maneira diferente embriões de touros de AF e BF; provando que miRNAs espermáticos possuem papel na regulação e determinação da fertilidade. Estes estudos possuem grande importância na geração de conhecimentos sobre os miRNAs espermáticos e apresentam resultados pioneiros que confirmam que o espermatozoide bovino contribui com mais que o DNA ao desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Espermatozoides. ncRNAs. miRNAs. Exossomos. Estresse térmico.

ABSTRACT

ALVES, M.B.R. **Profile of microRNAs present in semen and embryos and their relationship to fertility.** [Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação com a fertilidade]. 2018. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Bulls fertility relies of many factors. In concern to sperm cells, it depends of sperm quality (SQ; morphofunctional features) and sperm molecular components. Due to the fact that sperm quality is not always related with fertility, the effect of many molecular factors on fertility has been intensively studied. miRNAs, which have post transcriptional action, are present on sperm cells and are important to spermatogenesis, sperm maturation and embryo development. However, the mechanisms by which they regulate male fertility are not completely understood. Thus, the objective of the present studies was to investigate the role of miRNAs on fertility regulation. On the first study, frozen-thawed semen batches of high ($54.3 \pm 1.0\%$; HF; $n=3$) and low fertility ($41.5 \pm 2.3\%$; LF; $n=3$) Aberdeen Angus (*Bos taurus*) bulls were analyzed in concern to SQ; were used in embryo *in vitro* production to produce and collect embryos of one cell, two cells and blastocysts; and were analyzed to the profile of 380 sperm miRNAs. The target genes of the miRNAs that presented different abundance levels on sperm cells and embryos of HF and LF bulls were investigated. Blastocysts diameter, cell number and proliferation index were also evaluated. Besides, in this study, we validated a new model to prove that some miRNAs are delivered by sperm cell to embryo. Data were analyzed by analyzes of variance (ANOVA) and Chi-Square. Signicante level was 5% unless otherwise stated. Among miRNAs evaluated, miR-216b presented less abundance on HF sperm cells ($P=0.08$) and HF zygotes ($P<0.05$). miR-216b target gene, *KRAS*, that is related with cell proliferation, presented high abundance ($P<0.05$) on HF two cells embryos such as the first clivage rate and the number of cells on blastocysts that were greater on this group. We also showed that miR-216b is delivered by sperm cells to embryos. On the second study, we used six Nelore (*Bos indicus*) bulls. Three bulls were submitted to testicular heat stress (HS group). Semen was collected three days before and 21 days after heat stress. Samples were analyzed in concern to SQ and to the profile of 380 miRNAs on sperm cells and on exossomes. Data were analyzed by ANOVA. Signicante level was 5%. HS presented 21 sperm miRNAs diferently abundant, but miRNAs from exossomes were not different between the HS and control groups. miR-126-5p and -146a presented less abundance on HS sperm cells and on BF bulls sperm cells of the first study. miR-216b was not different in the second study. Thus, we can conclude that 1) miRNAs are important to fertility;

2) there are miRNAs that are important to fertility and can be altered by spermatogenesis injuries; and 3) miR-216b is delivered by sperm cells to embryos and is important to initial embryo development regulating HF and LF embryos differently; showing that sperm miRNAs are important molecules for regulation and establishment of fertility. The studies here presented generate knowledge upon sperm miRNAs importance and present novel results that confirm that bull sperm cells contribute with more than DNA to embryo development.

Keywords: Sperm cells. ncRNAs. miRNAs. Exosomes. Heat stress.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características desejáveis para a dose de sêmen bovino criopreservado e comercializado no Brasil	28
Quadro 2 - Classificação do vigor espermático	30
Quadro 3 - Genes-alvo, tamanho do produto, tipo de primer e sequência dos primers selecionados para avaliação da abundância nos embriões.....	67
Quadro 4 – Genes-alvo do miR-216b fortemente validados	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da biossíntese e ação dos microRNAs	41
Figura 2 - Diagrama de Venn dos miRNAs detectados nos espermatozoides dos touros dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF).....	80
Figura 3 - Análise de Heatmap e dendrograma não supervisionados dos nove miRNAs diferentemente abundantes, considerando $P < 0,10$, nos espermatozoides dos touros dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF).....	81
Figura 4 - Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs diferentemente abundantes nos espermatozoides de alta e baixa fertilidade em A , top cinco exclusivamente detectados nos espermatozoides de alta fertilidade em B e top cinco exclusivamente detectados nos espermatozoides de baixa fertilidade em C	83
Figura 5 - Análise de Heatmap e dendrograma supervisionados da abundância dos sete miRNAs maduros detectados nos espermatozoides dos touros dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)	84
Figura 6 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) dos dois miRNAs diferentemente expressos nas 18 partidas de sêmen dos touros Angus de alta (AF) e baixa fertilidade (BF).....	84
Figura 7 - Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs miR-205 e miR-532.....	85
Figura 8 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) do miR-339a em partidas de touros da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) de alta (AF) e baixa fertilidade (BF) e em partidas de touros da raça Aberdeen Angus (<i>Bos taurus</i>) de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)	85
Figura 9 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) do miR-216b e miR-425-3p totais (maduro + imaturo) avaliados em zigotos produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogênética e em oócitos maduros.....	86
Figura 10 - Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs miR-126-5p, -339a, -425-3p, -532, -874 e -1225-3p que apresentaram maior abundância nos embriões de duas células do que nos oócitos maduros.....	88
Figura 11 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) e do miR-216b total (maduro+imaturo) nos espermatozoides dos touros AF e BF e nos embriões de uma	

e de duas células produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com os espermatozoides de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF), embriões partenogênicos e oócitos maduros.....	91
Figura 12 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) dos genes <i>KRAS</i> , <i>BECN1</i> e <i>JUN</i> nos zigotos produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade.....	92
Figura 13 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) dos genes <i>KRAS</i> , <i>BECN1</i> e <i>JUN</i> nos embriões de duas células produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade.....	93
Figura 14 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) dos genes <i>KRAS</i> e do miR-216b total nos embriões de uma e duas células produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com os espermatozoides de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF).93	
Figura 15 - Imagens de microscopia confocal de blastocistos marcados com a proteína KI-67. Em A, imagem de blastocisto produzido com espermatozoides de alta fertilidade marcado com a proteína KI-67. Em B, imagem de blastocisto controle negativo para a proteína KI-67.....	94
Figura 16 - Média e erro padrão da média da porcentagem de proliferação celular, do diâmetro e do número absoluto de células dos blastocistos de alta e baixa fertilidade avaliados no sétimo dia de desenvolvimento.....	95
Figura 17 - Média e erro padrão da média das taxas de polispermia dos tratamentos Conc-1, Conc-4, Conc-8 e Conc-16.....	96
Figura 18 - Imagens de microscopia de epifluorescência em aumento de 600x de embriões bovinos não polispérmicos apresentando dois pró-núcleos em A e B , embriões bovinos polispérmicos apresentando três pró-núcleos em C e quatro ou mais pró-núcleos em D , E e F	97
Figura 19 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-216b total nos zigotos produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com os espermatozoides de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF) em diferentes concentrações na gota de FIV (Conc-1 x Conc-8).....	98
Figura 20 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-216b total nos zigotos produzidos por fecundação <i>in vitro</i> em diferentes concentrações na gota de FIV (Conc-1 x Conc-8).....	99
Figura 21 - Modelo hipotético gráfico da regulação do miR-216b e do gene <i>KRAS</i> sobre o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos.....	105

Figura 22 - Análise de Heatmap e dendrograma não supervisionados dos 21 miRNAs diferentemente abundantes nos espermatozoides dos touros controle (CO) e submetidos ao estresse térmico testicular (grupo <i>heat stress</i> -HS).....	118
Figura 23 - Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs miR-9-5p, -15a, -18a, -20b, -30a-5p, -30b-5p, -30d, -30e-5p, -34b, -34c, -106b, -126-5p, -146a, -191, -192, -200b, -335 and -449a que apresentaram menor abundância nos espermatozoides dos touros submetidos ao estresse térmico testicular.....	119
Figura 24 - Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de vesículas exossomais isoladas do plasma seminal dos touros por meio de ultracentrifugação.....	119
Figura 25 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-126-5p em espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade em A e em espermatozoides de touros submetidos (grupo <i>heat stress</i>) ou não (grupo controle) ao estresse térmico testicular em B e do miR-146a em espermatozoides de touros submetidos ou não ao estresse térmico testicular em C	126
Figura 26 - Esquema ilustrativo sobre a importância dos miRNAs descritos nos estudos desta tese sobre os processos reprodutivos de touros.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média e erro padrão da média das características espermáticas convencionais considerando três partidas de cada touro dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)	73
Tabela 2 -	Média e erro padrão da média das características funcionais da motilidade avaliadas pelo sistema CASA e da integridade de membranas, função mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica avaliadas pela microscopia de fluorescência e citometria de fluxo considerando três partidas de cada touro dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF). 75	
Tabela 3 -	Seleção das partidas segundo as notas obtidas por cada partida de cada touro considerando a fórmula $\text{Nota} = (1,5 \times \text{MPROG}) + [(3 \times (100 - \text{MAI})) + [(2 \times (100 - \text{MEN})) + (3 \times \text{PIAIA})]$	76
Tabela 4 -	Média e erro padrão da média das características espermáticas convencionais considerando três partidas de sêmen de três touros de alta fertilidade (AF) e três partidas de sêmen de três touros de baixa fertilidade (BF).....	77
Tabela 5 -	Média e erro padrão da média das características funcionais da motilidade avaliadas pelo sistema CASA e da integridade das membranas, função mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica considerando três partidas de sêmen de três touros de alta fertilidade (AF) e três partidas de sêmen de três touros de baixa fertilidade (BF)	78
Tabela 6 -	Dados de desenvolvimento pré-implantacional dos blastocistos produzidos por PIVE utilizando espermatozoides de alta e de baixa fertilidade e PIVE de embriões partenogênicos.....	79
Tabela 7 -	Dados de desenvolvimento pré-implantacional dos zigotos produzidos por PIVE utilizando espermatozoides de alta e de baixa fertilidade	79
Tabela 8 -	Dados de desenvolvimento pré-implantacional dos embriões de duas células produzidos por PIVE utilizando espermatozoides de alta e de baixa fertilidade e PIVE de embriões partenogênicos	80
Tabela 9 -	Médias e erro padrão da média da abundância ($2^{-\Delta C_t}$) e número de amostras em que os miRNAs foram detectados (entre parênteses) em ordem decrescente de abundância dos miRNAs exclusivamente detectados nos espermatozoides dos touros de alta fertilidade (AF) e de baixa fertilidade (BF). Os cinco mais expressos	

	de cada grupo (destacados em negrito) foram selecionados para as análises subsequentes.....	82
Tabela 10 -	Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs totais (maduro + imaturo) avaliados em zigotos produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros.....	87
Tabela 11 -	Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs totais (maduro + imaturo) avaliados em embriões de duas células produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros	88
Tabela 12 -	Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs maduros avaliados em zigotos produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros.....	89
Tabela 13 -	Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs maduros avaliados em embriões de duas células produzidos por fecundação <i>in vitro</i> com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros.....	90
Tabela 14 -	Análise de homologia do miR-216b de bovinos em humanos.....	91
Tabela 15 -	Média e erro padrão da média do estágio dos blastocistos avaliados no sétimo dia de desenvolvimento embrionário	95
Tabela 16 -	Dados de produção de zigotos polispérmicos para a validação do modelo de indução de polispermia.....	97
Tabela 17 -	Média e erro padrão da média das características espermáticas convencionais e funcionais de touros submetidos ao estresse térmico testicular (grupo <i>heat stress</i>) ou não (grupo controle) considerando as avaliações espermáticas feitas sete dias antes (D-7) e 21 dias após (D+21) ao estresse.....	117
Tabela 18 -	Média e erro padrão da média das características das vesículas exossomais isoladas do plasma seminal de touros submetidos ao estresse térmico testicular	

(grupo <i>heat stress</i>) ou não (grupo controle) considerando as avaliações espermáticas feitas sete dias antes e 21 dias após ao estresse.....	121
Tabela 19 - Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro BF-1	158
Tabela 20 - Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro BF-2	159
Tabela 21 - Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro BF-3	160
Tabela 22 - Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro AF-1	161
Tabela 23 - Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro AF-2	162
Tabela 24 - Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro AF-3	163

SUMÁRIO

1. Introdução	23
2. Capítulo 1: Revisão de Literatura: “Da motilidade espermática aos miRNAs: novos atributos na predição da fertilidade masculina”	27
2.1. Avaliações espermáticas morfofuncionais	29
2.1.1. Avaliações espermáticas convencionais	29
2.1.2. Avaliações espermáticas funcionais	32
2.2. Avaliações espermáticas moleculares	34
2.2.1. Contribuições espermáticas para o desenvolvimento embrionário inicial.....	35
2.2.2. RNAs espermáticos.....	37
2.2.3. miRNAs	39
2.2.3.1. miRNAs e espermatogênese.....	42
2.2.3.2. miRNAs e maturação espermática	44
2.2.3.3. miRNAs e desenvolvimento embrionário	46
2.2.3.4. miRNAs e epigenética.....	47
2.2.3.5. miRNAs, qualidade espermática e fertilidade masculina.....	48
2.3. Considerações finais.....	50
3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”	51
3.1. Introdução	51
3.2. Material e Métodos	53
3.2.1. Reagentes	53
3.2.2. Declaração de ética	53
3.2.3. Experimento 1	53
3.2.3.1. Esquema experimental	53
3.2.3.2. Avaliações espermáticas morfofuncionais: convencionais e funcionais	54
3.2.3.2.1. Avaliações espermáticas convencionais.....	55
3.2.3.2.2. Avaliações espermáticas funcionais.....	56
3.2.3.3. Seleção das partidas utilizadas para as avaliações moleculares e produção <i>in vitro</i> de embriões	59
3.2.3.4. PIVE por fecundação <i>in vitro</i> e por ativação partenogenética	60
3.2.3.4.1. PIVE por fecundação <i>in vitro</i>	61
3.2.3.4.2. PIVE por ativação partenogenética.....	62
3.2.3.5. Avaliações moleculares.....	63
3.2.3.5.1. Avaliações da abundância dos miRNAs espermáticos.....	63
3.2.3.5.2. Avaliações da abundância dos miRNAs embrionários	65
3.2.3.5.3. Avaliações da abundância dos mRNAs espermáticos.....	66
3.2.1.6. Imunofluorescência para análise de proliferação celular em blastocistos	68
3.2.1.7. Avaliação do estágio de desenvolvimento dos blastocistos	69

3.2.1.8. Análise de enriquecimento funcional	69
3.2.1.9. Análise estatística	69
3.2.2. Experimento 2	70
3.2.2.1. Validação do modelo de polispermia	70
3.2.2.2. Avaliação da abundância de miR-216b nos embriões controle e induzidos	71
3.2.2.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) e coletas dos embriões	71
3.2.2.4. Avaliação da quantidade de pró-núcleo	72
3.2.2.5. Avaliação da abundância do miR-216b	72
3.2.2.6. Análise estatística	72
3.3. Resultados	73
3.3.1. Experimento 1	73
3.3.1.1. Caracterização da qualidade espermática dos touros	73
3.3.1.2. Seleção das partidas utilizadas para as avaliações moleculares e produção <i>in vitro</i> de embriões	76
3.3.1.3. Avaliação das características espermáticas convencionais e funcionais das partidas selecionadas	77
3.3.1.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões	79
3.3.1.5. Avaliações moleculares	80
3.3.1.5.1. Avaliações espermáticas moleculares	80
3.3.1.5.2. Avaliações embrionárias moleculares	85
3.3.1.6. Avaliação da proliferação celular e do estágio de desenvolvimento dos blastocistos	94
3.3.2. Experimento 2	95
3.4. Discussão	99
3.5. Conclusão	106
4. Capítulo 3: “O estresse térmico testicular altera o perfil de miRNAs espermáticos”	108
4.1. Introdução	108
4.2. Material e Métodos	110
4.2.1. Reagentes	110
4.2.2. Declaração de ética	110
4.2.3. Esquema experimental	110
4.2.4. Avaliações espermáticas morfofuncionais	111
4.2.5. Obtenção dos espermatozoides	112
4.2.6. Obtenção e avaliações dos exossomos	113
4.2.7. Caracterização dos exossomos	113
4.2.8. Análise de miRNAs dos espermatozoides e exossomos	114
4.2.9. Análise de enriquecimento funcional	115
4.2.10. Análise estatística	115
4.3. Resultados	116
4.4. Discussão	122
4.5. Conclusão	124
5. Considerações finais	125
Referências	129
Apêndice A	152

Apêndice B 153

Apêndice C 154

Apêndice D 157

Apêndice E 158

Apêndice F 164

1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico do potencial fértil reprodutivo masculino apresenta grande importância na medicina humana e veterinária. Na medicina humana, 10 a 15% dos casais possuem alguma alteração relacionada à fertilidade (MOSHER; PRATT, 1988; DE KRETZER; BAKER, 1999; EVERS, 2002). Destes casos, cerca de 50% estão relacionados à infertilidade masculina (FERLIN et al., 2007; KOVAC; PASTUSZAK; LAMB, 2013). Embora na medicina veterinária existam poucos dados sobre a prevalência da infertilidade masculina, esta acomete todas as espécies domésticas e, especificamente em animais de produção, pode resultar em sérios prejuízos econômicos.

No Brasil, de acordo com informações da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2017), foram comercializadas cerca de 12 milhões de doses de sêmen bovino criopreservado em 2017, dobrando o número de doses vendidas em relação ao ano de 2002. Paralelamente, a porcentagem de inseminações artificiais em tempo fixo (IATFs), que correspondia a 1% das inseminações artificiais (IAs) totais realizadas no Brasil em 2002, passou a corresponder a 85% das IAs em 2017. Majoritariamente, as IATFs realizadas no Brasil empregam o sêmen criopreservado e a associação da IATF com o uso de sêmen criopreservado tem gerado taxas médias de prenhez de 52% (BARUSELLI et al., 2018). Diante deste cenário, torna-se muito importante buscar por métodos que consigam prever melhor o potencial fértil das amostras espermáticas. Dito isso, o estabelecimento de técnicas que consigam identificar com maior precisão partidas com alto potencial fértil pode resultar em aumentos na taxa de prenhez média atual; da mesma forma, técnicas que consigam identificar quais partidas devem ser descartadas podem evitar que taxas menores que a taxa média de 52% ocorram. Desta forma, a busca por ferramentas precisas que indiquem o potencial fértil de amostras espermáticas se faz muito importante e é o ensejo de diversos grupos de pesquisa.

Assim, com o objetivo de buscar técnicas com alto poder de prever a fertilidade, muitos estudos têm investigado novos aspectos ligados ao sêmen que apresentem alta correlação com a fertilidade e que possam prever o potencial fértil do indivíduo ou da amostra espermática. Entretanto, é um grande desafio encontrar uma única característica que justifique a fertilidade masculina como um todo, visto que a fertilidade é multifatorial (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993). Portanto, embora muitos estudos investiguem características e marcadores seminais que consigam prever com clareza o potencial fértil do macho ou da amostra espermática (GILLAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012b, 2014; ZHANG et al.,

2015), até o momento não foi encontrada uma técnica laboratorial isolada ou um único marcador molecular eficiente para determinar a qualidade e garantir a fertilidade da amostra seminal (LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; BRAUNDMEIER; MILLER, 2001; ARRUDA et al., 2011; KOVAC; PASTUSZAK; LAMB, 2013). Dessa forma, apesar de ter sido postulada em 1993, isto é, há 25 anos atrás, a ideia proposta por Amann e Hammerstedt (1993) de que quanto mais características espermáticas forem avaliadas, mais preciso será o diagnóstico do potencial fértil da amostra seminal, é a mais aceita até os dias atuais na predição da fertilidade. Ademais, pelo fato da fertilidade ser multifatorial, a melhor maneira de se conseguir dados autênticos sobre o desempenho do reprodutor ou da amostra espermática, é por meio da obtenção dos dados do desempenho da fertilidade *in vivo* a campo (ZHANG et al., 1999; ARRUDA et al., 2011; CELEGHINI et al., 2017). Entretanto, a obtenção de dados de fertilidade a campo não é uma realidade, visto que demanda altos custos e tempo (ARRUDA et al., 2011). Assim, busca-se identificar características espermáticas que apresentem alta correlação com a fertilidade e que estejam relacionadas com a capacidade dos espermatozoides em alcançar o sítio de fecundação, fecundar o oócito e contribuir com o desenvolvimento embrionário inicial.

As características espermáticas convencionais e funcionais, tais como motilidade, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, apresentam alta correlação com a fertilidade (FARRELL et al., 1998; TARTAGLIONE; RITTA, 2004; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; GILLAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014; DAVID et al., 2015; SELLEM et al., 2015; ALVES et al., 2017). No entanto, muitas delas são subjetivas e possuem variações em função do emprego de diferentes técnicas laboratoriais para as análises (BRITO, 2010; VINCENT et al., 2012). Além disso, por observações na rotina do nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa, existem amostras de sêmen que mesmo possuindo estas características classificadas como satisfatórias, possuem fertilidade menor que a média (KOVAC; PASTUSZAK; LAMB, 2013; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS, 2016; FLOREZ-RODRIGUEZ, 2017). Concomitante a estes achados, a comunidade científica convenceu-se que o espermatozoide contribui com mais que o DNA ao embrião e que existem fatores moleculares importantes para a célula espermática relacionados com a espermatogênese, maturação espermática e desenvolvimento embrionário inicial (KRAWETZ, 2005). Atualmente, é bem conhecido que o espermatozoide contribui com organelas como os centríolos e com proteínas como a PLC ζ (fosfolipase C zeta) para o desenvolvimento embrionário inicial (KRAWETZ, 2005; ODIA; SWANSON; KRAWETZ, 2018). Além disso, a presença de moléculas de RNAs espermáticos também tem sido descrita

como importante para o desenvolvimento do embrião, dentre esses os microRNAs/miRNAs (LIU et al., 2012; YUAN et al., 2016). Assim, fatores moleculares ligados ao espermatozoide podem estar envolvidos na determinação do potencial de fertilidade, dentre eles os miRNAs (GOVINDARAJU et al., 2012; ABU-HALIMA et al., 2014a; FAGERLIND et al., 2015; YUAN et al., 2016; ALVES et al., 2017; BARCELÓ et al., 2018).

Os miRNAs, por serem reguladores pós-transcricionais, possuem grande potencial na modulação das características reprodutivas. Diversos estudos já mostraram o papel dessas moléculas na espermatogênese, na maturação espermática e no desenvolvimento embrionário inicial (KRAWETZ et al., 2011; LIU et al., 2012; HU et al., 2013; KOTAJA, 2014; YADAV; KOTAJA, 2014; LUO et al., 2015; NIXON et al., 2015; YUAN et al., 2016). Existem evidências de que os miRNAs presentes no sistema reprodutivo possuem alta regulação apresentando, por exemplo, diferentes perfis ao longo do epidídimo (BELLEANNÉE et al., 2013). Além disso, diferentes perfis de miRNAs foram descritos nos diferentes tipos celulares presentes no epitélio seminífero (HAYASHI et al., 2008; SMORAG et al., 2012). No epidídimo, os miRNAs foram encontrados nas diferentes células presentes no epitélio epididimário e também no fluido epididimário inserido em estruturas denominadas de epididiossomas (BELLEANNÉE et al., 2013), vesículas celulares exossomais que possuem importante papel na comunicação celular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Estudos com humanos e bovinos têm mostrado que há diferenças nos perfis de miRNAs seminais entre amostras com diferentes potenciais de fertilidade (WANG et al., 2011; GOVINDARAJU et al., 2012; ABU-HALIMA et al., 2014b; FAGERLIND et al., 2015). Ainda, há evidências de que os miRNAs estão envolvidos com características espermáticas morfofuncionais como motilidade, anormalidades espermáticas morfológicas e com a deficiência na condensação da cromatina espermática (CURRY; SAFRANSKI; PRATT, 2011; ZHANG et al., 2015; CAPRA et al., 2017). Outros estudos mostram que existem miRNAs transmitidos exclusivamente dos espermatozoides aos zigotos e que estes possuem papel no desenvolvimento embrionário inicial (LIU et al., 2012; YUAN et al., 2016). Além disso, os miRNAs são moléculas pequenas de RNA, estáveis, conservadas entre as espécies e que podem ser avaliadas por diversas técnicas hoje acessíveis em diversos centros de pesquisa. Assim, por atuarem em diversos mecanismos reprodutivos e por suas características particulares, os miRNAs possuem grande potencial em serem biomarcadores de fertilidade.

Dessa forma, tendo em vista que 1) há necessidade de maior precisão na identificação do potencial fértil de amostras espermáticas; 2) as características convencionais e funcionais espermáticas nem sempre são suficientes para prever o potencial de fertilidade da amostra

espermática; e 3) os miRNAs possuem características favoráveis em serem identificados como biomarcadores e moduladores das funções reprodutivas, a hipótese central do presente estudo é que miRNAs presentes nos espermatozoides possuem papel sobre a fertilidade regulando o desenvolvimento embrionário inicial e sendo regulados pela espermatogênese. Para isso, investigou-se inicialmente se miRNAs de origem espermática apresentam relação com diferentes fenótipos de fertilidade. Após essa primeira investigação, o estudo teve por objetivo identificar como esses miRNAs espermáticos poderiam realizar essa regulação sobre o desenvolvimento embrionário inicial. Por fim, foi investigado se estes miRNAs eram entregues pelo espermatozoide e se eles poderiam ter seus níveis de abundância alterados pela indução de insultos à espermatogênese. Assim, a presente tese foi dividida em dois estudos. O primeiro estudo, abordado no Capítulo 2 desta tese, teve por objetivo investigar a importância dos miRNAs no desenvolvimento embrionário inicial de embriões gerados de amostras de sêmen criopreservado semelhantes quanto às características espermáticas convencionais e funcionais, mas que apresentam diferentes taxas de fertilidade *in vivo*. O segundo estudo, abordado no Capítulo 3 desta tese, teve por objetivo investigar o efeito da injúria testicular sobre o perfil de miRNAs dos espermatozoides e dos exossomos presentes no plasma seminal. Com estes dois estudos espera-se investigar o papel dos miRNAs na determinação e regulação da fertilidade e gerar conhecimentos para entender **como a abundância dos miRNAs se diferenciam** em amostras de diferentes fenótipos de fertilidade em bovinos, **qual a possível origem destes miRNAs** e **qual a importância destes miRNAs no desenvolvimento embrionário inicial**. Para melhor compreensão, o Capítulo 1 apresenta uma Revisão de Literatura abordando os temas mais relevantes para introduzir o assunto. Os Capítulos 1, 2 e 3 serão submetidos à publicação. Ao final da tese, no apêndice A, é apresentado um artigo de revisão relacionado a esta tese, já publicado.

2. CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura: “Da motilidade espermática aos miRNAs: novos atributos na predição da fertilidade masculina”

Na medicina humana, a fertilidade, palavra originária do latim *fertilitate*, é definida como a capacidade de uma gravidez clínica ser estabelecida (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2017). Da mesma forma, em biologia, o termo é empregado para caracterizar a habilidade de um indivíduo em gerar novos descendentes. Historicamente, o termo é usado desde os primórdios da humanidade com grande importância em diversas culturas por expressar a habilidade em deixar descendentes e em produzir alimentos (MOURA; SOUZA; SCHEFFER, 2009). Na medicina veterinária, a definição de fertilidade pode ser estendida e apresenta uma grande aplicação no sentido que, dependendo da espécie, as informações de fertilidade individual podem gerar bancos de dados robustos que tornem possível concluir com maior precisão sobre a fertilidade dos reprodutores.

Na produção animal, a seleção de animais superiores em relação à capacidade reprodutiva ao longo dos anos resultou na diminuição da frequência dos problemas relacionados à fertilidade. No entanto, tanto em fêmeas quanto em machos, distúrbios reprodutivos ainda são recorrentes. O avanço das técnicas de reprodução assistida nos rebanhos bovinos, tais como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), contribui para gerar maior pressão de seleção sobre o potencial fértil e, consequentemente, aumenta a detecção de falhas reprodutivas. Assim, muitos estudos têm sido feitos focados em determinar protocolos hormonais e estratégias para melhorar o potencial reprodutivo das fêmeas (BARUSELLI et al., 2006; PUGLIESI et al., 2016; MARQUES; et al., 2018). Em relação aos machos, o enfoque maior é dado ao sêmen utilizado nos programas de IATF. Neste sentido, diversos estudos são realizados com a finalidade de aprimorar a qualidade do sêmen utilizado (OLIVEIRA et al., 2012a), melhorar o processo de criopreservação espermática (MORAES et al., 2010) e ainda, aperfeiçoar o diagnóstico das partidas de sêmen aptas e não aptas a serem utilizadas nos programas de IATF (VINCENT et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013, 2014).

No tocante ao diagnóstico e identificação das partidas aptas e não aptas a entrarem nos programas de IATF, o manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) preconiza que o sêmen bovino criopreservado e comercializado no Brasil apresente algumas características mínimas pós-descongelamento, a fim de garantir a sua qualidade conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Características desejáveis para a dose de sêmen bovino criopreservado e comercializado no Brasil

Características	Valores
Motilidade espermática	$\geq 30\%$
Vigor	≥ 3
Número de espermatozoides por palheta (0,25mL e 0,50mL)	$\sim 10.10^6$ sptz móveis
Espermatozoides normais	$\geq 70\%$
Defeitos maiores	$\leq 10\%$

Fonte: CBRA (2013).

As características espermáticas listadas pelo manual do CBRA (motilidade, vigor e morfologia) podem ser definidas, segundo Arruda et al. (2011), como **técnicas clássicas/convencionais** de avaliação espermática, ou primeiro estágio da avaliação espermática. Estas características geralmente possuem alta correlação com a fertilidade e são realizadas em toda a avaliação espermática de rotina. No entanto, algumas amostras de sêmen podem ser semelhantes quanto essas características convencionais e apresentarem potencial de fertilidade distinto (OLIVEIRA et al., 2014). Assim, atualmente existem outros testes que podem ser realizados para avaliar as partidas de sêmen que surgiram com o advento de novas ferramentas como o sistema computadorizado de avaliação da motilidade (*Computer-Assisted Sperm Analysis - CASA*), a microscopia de fluorescência e a citometria de fluxo que permitiram maior precisão na avaliação das estruturas celulares e da função espermática, tornando a avaliação morfofuncional espermática mais refinada e objetiva. Estas técnicas de **avaliações funcionais** espermáticas podem ser consideradas como o segundo estágio da avaliação espermática (ARRUDA et al., 2011) que consistem na avaliação da integridade dos componentes celulares espermáticos bem como na avaliação da funcionalidade dos mesmos. A técnica de avaliação da porcentagem de espermatozoides com integridade das membranas plasmática, acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), padronizada por Celeghini et al. (2007), pertence a este grupo. Normalmente há alta relação na porcentagem de espermatozoides PIAIA com a fertilidade (OLIVEIRA et al., 2014). Entretanto, para algumas amostras espermáticas, essas características ainda não são eficientes em detectar distintos potenciais férteis (SELLEM et al., 2015; SANTOS, 2016).

Assim, mesmo com o uso de técnicas avançadas que avaliam atributos espermáticos relacionados à integridade e funcionalidade de componentes celulares, alguns casos de falhas de fertilidade não são suficientemente explicados e, muitas vezes, são caracterizados como decorrentes de causas idiopáticas (KOVAC; PASTUSZAK; LAMB, 2013; KOTAJA, 2014).

Desta forma, avaliações de outros atributos espermáticos podem ser realizadas para prever a fertilidade: as **avaliações moleculares**, ou terceiro estágio da avaliação espermática (ARRUDA et al., 2011; ALVES et al., 2017). A utilização das técnicas moleculares permite que se busquem por atributos espermáticos que possam prever o potencial fértil da amostra espermática quando as características avaliadas pelas técnicas convencionais e funcionais, agrupadas como avaliações **morfofuncionais**, não forem eficientes em diagnosticar o potencial fértil das mesmas (RONCOLETTA et al., 2006; GOVINDARAJU et al., 2012; ABU-HALIMA et al., 2014b; FAGERLIND et al., 2015). Dessa forma, com o objetivo de abordar desde a motilidade até o miRNA espermático, essa revisão foi dividida em tópicos de modo a abranger as características espermáticas avaliadas pelas técnicas morfofuncionais, discutindo sobre as avaliações convencionais e funcionais realizadas e a relação destas com a fertilidade. Em seguida, os tópicos abordarão as características relacionadas às avaliações moleculares destacando os miRNAs espermáticos e o “estado da arte” destes na predição da fertilidade.

2.1. Avaliações espermáticas morfofuncionais

2.1.1. Avaliações espermáticas convencionais

Segundo Arruda et al. (2011), as características de motilidade subjetiva, vigor e morfologia estão agrupadas como avaliações espermáticas clássicas ou convencionais. Para a realização destas avaliações, se faz necessário a utilização de um microscópio óptico de campo claro, de preferência com contraste de fase (CBRA, 2013). A motilidade subjetiva representa a porcentagem de espermatozoides móveis da amostra espermática (CBRA, 2013). O vigor espermático avalia a intensidade do movimento espermático (Quadro 2), sendo que espermatozoides com maior movimento progressivo e maior velocidade possuem maior vigor (CBRA, 2013). Por fim, a morfologia espermática caracteriza a porcentagem de células que apresentam defeitos na forma, chamadas frequentemente de porcentagem de células anormais (BLOM, 1973). Inúmeras técnicas podem ser empregadas para a avaliação da morfologia espermática (CBRA, 2013).

Quadro 2 – Classificação do vigor espermático

Escore	Definição
5	Progressivo retilíneo e muito rápido
4	Progressivo retilíneo e rápido
3	Intermediário
2	Lento
1	Exclusivamente oscilatório

Fonte: CBRA (2013).

A facilidade e simplicidade na execução, o baixo custo e, principalmente, a alta relação com a fertilidade das avaliações convencionais (GILLAN et al., 2008) fazem com que estas sejam rotineiramente realizadas nas avaliações espermáticas (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001; FOOTE, 2003; SEIDEL, 2012). No entanto, embora essas avaliações muitas vezes correlacionem-se com a fertilidade, há grande oscilação nos resultados devido a variações inerentes à técnica empregada e à amostra; além disso, existem variações relacionadas ao elevado número de diferentes técnicas que podem ser usadas para avaliar uma mesma característica espermática (SEIDEL, 2012). Sendo assim, as técnicas de avaliação desse primeiro grupo devem ser realizadas por equipes bem treinadas sendo, de preferência, realizada por duas pessoas e, em condições experimentais, devem ser realizadas sem o conhecimento prévio da amostra (SEIDEL, 2012). De fato, essas avaliações estão intimamente relacionadas com a capacidade dos espermatozoides em atravessar a barreira muco-cervical, o útero, a junção útero-tubárica e alcançar a ampola da tuba uterina, onde irão encontrar o oócito e possivelmente fecundá-lo (SAACKE; NADIR; NEBEL, 1994), o que torna imprescindível a avaliação dessas características convencionais em todas as análises espermáticas (SEIDEL, 2012).

Em estudo com touros da raça Holandesa divididos em grupos de alta e baixa fertilidade, a motilidade espermática não apresentou diferença entre os grupos (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997). Nesse estudo, embora não tenha sido observada diferença da motilidade entre os touros de alta e baixa fertilidade, essa apresentou correlação positiva com a fertilidade ($r=0,53$; $P<0,01$) (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997). Gillan et al. (2008) também observaram correlação positiva ($r=0,67$; $P=0,03$) entre a motilidade espermática subjetiva e a taxa de fertilidade a campo de touros. Entretanto, Hall (1981) estudando a infertilidade masculina humana observou que 29% dos pacientes que foram classificados com motilidade espermática normal, apresentavam baixa fertilidade em testes *in vitro*. Ademais, Flowers (1997) mostrou que amostras espermáticas com motilidade acima de 60% não apresentam relação com a

fertilidade. Dessa forma, a avaliação da motilidade espermática por si só, embora seja importante de ser realizada criteriosamente nas amostras espermáticas, possui resultados muito variados em relação a sua predição da fertilidade e não é capaz de prever a fertilidade quando atinge determinado limiar. Diversos estudos têm mostrado a importância da motilidade, seja ela avaliada de maneira subjetiva ou pelo sistema CASA (que será abordada no próximo tópico), como preditora da fertilidade quando inserida em modelos estatísticos juntamente com outras variáveis (OLIVEIRA et al., 2013; SELLEM et al., 2015).

A avaliação da morfologia espermática, assim como a avaliação da motilidade espermática, é rotineiramente realizada nos espermogramas (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001). A morfologia espermática possui grande importância em ser avaliada, visto que verifica alterações na estrutura espermática que podem ser relacionadas com disfunções na espermatogênese, na espermiogênese, na maturação espermática, dentre outros processos (BARTH; OKO, 1989; ARRUDA et al., 2015). Segundo Seidel (2012), essa característica espermática apresenta alta relação com a fertilidade quando a amostra apresenta mais de 30% de anormalidades. Em touros de fertilidades diferentes foi observada diferença na quantidade de células com defeitos espermáticos, sendo maior a quantidade de células normais no grupo de alta fertilidade (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997). Nesse mesmo estudo, a taxa de espermatozoides normais apresentou correlação de 59% ($P=0,01$) com a fertilidade dos touros. Gillan et al. (2008) e Morrel et al. (2018) verificaram correlação negativa ($P<0,05$) de 76% e de 62%, respectivamente, entre a quantidade de células anormais e a fertilidade.

Entretanto, apesar de haver correlação com a fertilidade, a avaliação da morfologia torna-se limitada por existir diversificada gama de técnicas empregadas para sua avaliação, sendo técnicas subjetivas. Além disso, há diversas formas de classificação dos espermatozoides e a execução das técnicas deve ser realizada por profissionais extremamente treinados (ARRUDA et al., 2011). Sendo assim, torna-se difícil o estabelecimento de um padrão relacionado a esta característica espermática. Da mesma forma, torna-se difícil comparar os valores entre diferentes laboratórios e grupos de pesquisa (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001). Atualmente, existem ferramentas disponíveis para tornar as avaliações morfológicas espermáticas menos subjetivas. Entretanto poucos grupos a utilizam, pouco se conhece sobre a relação dos resultados destas ferramentas com a fertilidade e, ainda, elas possuem algumas limitações relacionadas ao manuseio da técnica que causam variações nos resultados obtidos (ARRUDA et al., 2011).

Contudo, mesmo com limitações, as avaliações convencionais espermáticas são de grande importância para a rotina de exames andrológicos e devem ser realizadas em todos os

exames de avaliações espermáticas. No entanto, apesar de possuírem na maioria das vezes alta correlação com a fertilidade, em alguns casos não são eficientes em diagnosticar as causas das falhas de fertilidade da amostra espermática. Dessa forma, se faz necessária a investigação de outros atributos espermáticos.

2.1.2. Avaliações espermáticas funcionais

Como a fertilidade envolve um processo complexo em que a célula espermática precisa alcançar o local exato de fecundação, penetrar o oócito e ativar o desenvolvimento embrionário (SAACKE et al., 2000), é necessário que o movimento espermático, a integridade das estruturas celulares e a função celular estejam em total harmonia (ARRUDA et al., 2011). Desta forma, a avaliação destas características é de grande importância e necessidade na rotina dos laboratórios de Andrologia. Entretanto, apesar de essas avaliações serem realizadas de forma subjetiva conforme abordado anteriormente, muitas ferramentas têm sido empregadas a fim de minimizar a subjetividade das avaliações.

A aplicação de métodos computadorizados, da microscopia de fluorescência e da citometria de fluxo são alguns exemplos da tentativa de diminuir o grau de subjetividade das avaliações andrológicas. Estas ferramentas estão englobadas no segundo estágio das avaliações, em que estão inseridas as técnicas de avaliação das características de motilidade pelo sistema computadorizado de análise da motilidade (CASA) e as técnicas de avaliação de função e estrutura espermáticas com sondas fluorescentes por meio da microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.

Diversos estudos têm relacionado os resultados obtidos pela análise da motilidade pelo sistema CASA com a fertilidade. Por este sistema, é possível a aquisição de imagens digitalizadas e a obtenção de informações da porcentagem de espermatozoides móveis, da média da velocidade e da progressividade do movimento espermático (ARRUDA et al., 2011). Entretanto, existem diversos sistemas de análise disponíveis que usam diferentes formas de avaliação e, por isso, não apresentam resultados comparáveis (VINCENT et al., 2012). Além disso, a técnica sofre a interferência de muitos fatores externos, tais como a concentração espermática utilizada e a presença de grumos dos diluidores na amostra (BRITO, 2010). Entretanto, apesar das limitações, a avaliação da cinética espermática pelo sistema CASA tem mostrado correlação com a fertilidade quando bem realizada (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001) e vem sendo usada nos exames de rotina da Andrologia.

Em relação aos resultados obtidos pelo sistema CASA, a característica de velocidade progressiva (VSL) apresentou correlação positiva ($P=0,04$) de 63,6% com a fertilidade em touros (GILLAN et al., 2008). Entretanto, em outro estudo, também em touros, foi observada correlação negativa ($r=-0,34$; $P<0,05$) desta característica com a fertilidade (SELLEM et al., 2015). Já o índice de oscilação dos espermatozoides [WOB, calculado pela divisão de VAP (velocidade de trajeto) por VCL (velocidade curvilinear)] apresentou correlação positiva de 57% com a fertilidade (MORRELL et al., 2018). Farrel et al. (1998) realizaram análises de regressões com as características avaliadas pelo sistema CASA na predição da fertilidade; o conjunto de ALH (amplitude lateral de cabeça) e motilidade progressiva apresentou r^2 de 0,68; e o conjunto de ALH, BCF (frequência de batimento), LIN (linearidade), VAP (velocidade de trajeto) e VSL (velocidade progressiva) apresentou r^2 de 0,98 em predizer a fertilidade (FARRELL et al., 1998). Dessa forma, o sistema CASA pode ser associado à fertilidade, mas ainda são necessários mais estudos para estabelecer os valores que são capazes de determinar e predizer a fertilidade.

Além das avaliações computadorizadas, neste estágio de avaliações estão também as técnicas com sondas fluorescentes que verificam integridade de estruturas espermáticas e também a função das mesmas. A microscopia de fluorescência e a citometria de fluxo podem ser empregadas para este fim a depender do objetivo da avaliação e da disponibilidade da ferramenta. A grande vantagem da citometria é permitir a avaliação de um expressivo número de espermatozoides. A técnica normalmente avalia cerca de 10.000 espermatozoides enquanto que pela microscopia de fluorescência normalmente são contadas e avaliadas 200 células. Entretanto, apesar dos benefícios, o citômetro de fluxo é um aparelho caro que necessita de muitos cuidados e de pessoal qualificado para o manuseio (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005). Em estudo comparando a análise da reação acrossomal espermática avaliada pela microscopia de fluorescência ou pela citometria de fluxo, observou-se que a citometria de fluxo apresentou maior repetibilidade dos resultados, mas não foi capaz de possibilitar a obtenção de grandes detalhes durante a avaliação prejudicando a avaliação (JANUSKAUSKAS et al., 2000). Dessa forma, as duas ferramentas têm sido amplamente empregadas nas avaliações espermáticas dependendo do objetivo e da disponibilidade do equipamento.

Em relação aos resultados utilizando essas ferramentas, Oliveira et al. (2014) avaliaram, por meio da microscopia de fluorescência, a porcentagem de espermatozoides PIAIA (espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial) de três partidas de sêmen do mesmo touro que mostraram semelhança quanto às avaliações espermáticas convencionais. As partidas foram então utilizadas em

programas de IATF, sendo as taxas de prenhez das vacas impactadas pela porcentagem de células PIAIA. A partida de sêmen com maior porcentagem de PIAIA (44,5%) apresentou a melhor taxa de prenhez (64,7%). Da mesma forma, a partida com menor porcentagem de PIAIA (8,5%) apresentou a pior taxa de prenhez (36,2%) e a partida com porcentagem de PIAIA intermediária (23%) apresentou taxa de prenhez intermediária (50%). Igualmente, a avaliação da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) pelo espermatozoide por meio da citometria de fluxo apresentou correlação positiva ($P < 0,05$) de 49% com a fertilidade (SELLEM et al., 2015). Já a integridade da membrana plasmática e a fragmentação de DNA, também avaliados por citometria de fluxo, não apresentaram correlação com a fertilidade (SELLEM et al., 2015). Florez-Rodriguez (2017) também não observou diferença na integridade de membrana plasmática, na função mitocondrial, na integridade acrossomal e na peroxidação lipídica entre amostras espermáticas de touros de alta e baixa fertilidade avaliados pela citometria de fluxo.

Com isso, embora as avaliações funcionais sejam eficientes em diagnosticar o potencial fértil, muitas vezes são observadas partidas que possuem essas características classificadas como satisfatórias e mesmo assim não possuem um bom desempenho reprodutivo (OLIVEIRA et al., 2014; SELLEM et al., 2015; FLOREZ-RODRIGUEZ, 2017). Essa limitação ocorre pelo fato de a fertilidade ser multifatorial e, assim, quanto mais avaliações forem realizadas, maior será o poder de predição da fertilidade (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993). Assim, muitas vezes, as características morfofuncionais realizadas de maneira isolada não são eficientes para predizer a fertilidade de uma amostra espermática. Pensando nessas amostras, torna-se necessário encontrar outros atributos espermáticos que atendam os diversos processos que resultam na fertilidade e que considerem os aspectos peculiares de uma célula tão particular, o espermatozoide. Desta forma, nesse contexto, a busca por fatores moleculares se torna de grande importância (LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; BRAUNDMEIER; MILLER, 2001; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; OLIVEIRA et al., 2013; SELLEM et al., 2015).

2.2. Avaliações espermáticas moleculares

Atualmente, as avaliações espermáticas moleculares relacionadas à qualidade espermática consistem basicamente na investigação de proteínas espermáticas (SUTOVSKY; TERADA; SCHATTEN, 2001; RONCOLETTA et al., 2006; BUCKMAN et al., 2013; AARABI et al., 2014; AGARWAL; BERTOLLA; SAMANTA, 2016; INTASQUI et al., 2016;

SINGH et al., 2018). A presença de grande abundância da proteína SPTRX-3 (proteína tioredoxina-3 específica de espermátócito/espermátide) em espermatozoides é associada com baixa taxa de desenvolvimento embrionário (BUCKMAN et al., 2013). Da mesma forma, a elevada abundância da proteína espermática Ubiquitina é associada com baixa concentração e motilidade espermática e altas taxas de células defeituosas e de fragmentação de DNA (SUTOVSKY; HAUSERS; SUTOVSKY, 2004). Já a presença da proteína PAWP (proteína WW pós-acrossomal), associada com a ativação oocitária e presente próximo a região equatorial do espermatozoide, está relacionada com amostras que possuem alto potencial fértil (AARABI et al., 2014). Essas proteínas normalmente são sintetizadas a partir da transcrição de RNAs mensageiros das espermátides, sendo acumuladas ou degradadas durante a fase de espermiogênese (KRAWETZ, 2005; SUTOVSKY et al., 2015). Atualmente, se sabe que a tradução de proteínas pode ser regulada também por outros tipos de RNAs, chamados de RNAs não codificadores onde estão inseridos os miRNAs (BARTEL, 2004, 2018).

2.2.1. Contribuições espermáticas para o desenvolvimento embrionário inicial

Por muitos anos acreditou-se que o espermatozoide possuía a única e exclusiva função de transportar material genético ao oócito (KRAWETZ, 2005). Entretanto, no final do século 20, foram descritos casos de infertilidade humana resultantes de defeitos na união de espermatozoides com oócitos devido a falhas da estrutura celular relacionadas ao espermatozoide. Com isso, foi descoberto que os espermatozoides de mamíferos não roedores são responsáveis por transmitir os centríolos e formar em colaboração com o oócito, o centrossomo, estrutura essa responsável por guiar a aproximação do pró-núcleo feminino com o pró-núcleo masculino (SIMERLY et al., 1995; SCHATTEN; SUN, 2009, 2011). Posteriormente, foi descoberto também que os espermatozoides são responsáveis por desencadear impulsos intracelulares de cálcio necessários para a ativação oocitária por meio da fosfolipase C zeta, a PLC ζ (SAUNDERS et al., 2002; KASHIR et al., 2010). Com estes impulsos, uma vez fecundado, o oócito maduro em metáfase II é capaz de retomar e progredir na divisão meiótica tornando possível a formação dos pró-núcleos feminino e masculino e a singamia que ocorrem normalmente cerca de 12 horas após a ativação oocitária (PERECIN et al., 2007; JONES; LOPEZ, 2013).

Assim, os espermatozoides ganharam o status de gametas que não são só responsáveis pelo transporte de material genético, mas que também contribuem com a ativação do oócito e com a estrutura celular do zigoto. Concomitantemente, RNAs de origem espermática foram

encontrados no embrião indicando que poderia haver regulação molecular no âmbito da transcrição sobre o desenvolvimento embrionário (KRAWETZ, 2005). A evidência da contribuição espermática com transcritos como clusterina e AKAP4 (proteína 4 ligada a quinase A), necessários para a fecundação e processo de morfogênese embrionária (OSTERMEIER et al., 2004; KRAWETZ, 2005), impulsionou a comunidade científica a investigar fatores moleculares, que são entregues pelo espermatozoide ao oócito, essenciais para a determinação da fertilidade. Assim, o espermatozoide, célula com núcleo altamente compactado e limitada quantidade de citoplasma, que até então contribuía com o genoma embrionário, componentes celulares e algumas proteínas específicas passou também a ser considerado importante na contribuição com outros fatores moleculares importantes para o desenvolvimento embrionário inicial. Consequentemente, muitos grupos começaram a investigar quais RNAs espermáticos eram transmitidos ao oócito e suas respectivas funções (OSTERMEIER et al., 2004; BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007).

A maioria dos RNAs espermáticos é transcrita e também inativada durante a etapa de espermiogênese sendo alguns RNAs estocados no espermatozoide nesta etapa (KRAWETZ, 2005). Durante a transição de espermátide para espermatozoide, ocorre ainda o processo de protaminação, em que as histonas são substituídas por protaminas, levando a consequente condensação nuclear espermática em estrutura de toroide culminando com o silenciamento da expressão gênica (BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007). Entretanto, 1% das histonas em camundongos e 10 a 15% das histonas em humanos e bovinos permanecem remanescentes nos espermatozoides sob a forma de nucleossoma (DE VRIES et al., 2012; SAMANS et al., 2014). Os nucleossomas remanescentes em espermatozoides humanos e bovinos estão localizados em regiões promotoras similares, indicando haver conservação da transcrição de genes específicos relacionados com o desenvolvimento embrionário inicial (SAMANS et al., 2014). Entretanto, apesar de ser evidente que espermatozoides carregam RNAs e indícios de que são capazes de transcrever alguns RNAs, essas células possuem pouca quantidade de RNA. Estima-se que um espermatozoide humano carregue 50 fg de RNAs longos (>200 nt) e 0,3 fg de pequenos RNAs não codificadores (<200 nt) (KRAWETZ, 2005; ODIA; SWANSON; KRAWETZ, 2018). Já um oócito possui de 0,5-1,5 ng de RNA (OLSZANSKA; BORGUL, 1990) e uma célula somática tem cerca de 10 pg de RNA e 1-3 pg de pequenos RNAs não codificadores.

2.2.2. RNAs espermáticos

Os RNAs espermáticos foram pela primeira vez descritos na década de 70 em espermatozoides murinos (BETLACH; ERICKSON, 1973) e bovinos (PAUL; DUERKSEN, 1975). Em seguida, no final da década de 80, foram descritos RNAs presentes na região nuclear de espermatozoides de ratos e humanos (PESSOT et al., 1989). Entretanto, respaldada pela limitada quantidade de citoplasma que o espermatozoide possui e pela alta condensação do DNA espermático (SHARMA; AGARWAL, 2011), a comunidade científica relevou estas evidências. Acreditava-se que o espermatozoide era uma célula transcricionalmente inerte e que os RNAs presentes no espermatozoide seriam advindos de contaminação mitocondrial ou de células somáticas (KRAWETZ, 2005).

Entretanto, apesar da maioria da comunidade científica estar convencida sobre a ausência de RNAs espermáticos, alguns grupos continuaram investigando os RNAs presentes no espermatozoide. Assim, na década de 90, a presença de RNAs em espermatozoides humanos foi novamente confirmada (KUMAR; PATEL; NAZ, 1993). Seis anos após, Miller e colaboradores (1999) sequenciaram os RNAs presentes em espermatozoides humanos e mostraram RNAs localizados no núcleo espermático (MILLER et al., 1999). Com estas evidências, a comunidade científica convenceu-se que de fato os espermatozoides possuem RNAs; restava então saber quais seriam os efeitos desses RNAs e a origem dos mesmos. Assim a investigação da relação dos RNAs espermáticos com a fertilidade começou a ser amplamente estudada (OSTERMEIER et al., 2002; KRAWETZ, 2005; ABU-HALIMA et al., 2014b; FAGERLIND et al., 2015).

Em 2002, Ostermeier et al. mostraram pela primeira vez a importância dos RNAs na fertilidade masculina. Este mesmo grupo de pesquisa, dois anos após, mostrou pela primeira vez que alguns transcritos são transmitidos exclusivamente do espermatozoide para o zigoto (OSTERMEIER et al., 2004). Esses fatos abriram perspectivas para novas pesquisas e os RNAs espermáticos, que antes eram considerados como presentes no espermatozoide ao acaso, começaram a ser investigados como possíveis marcadores de fertilidade (OSTERMEIER et al., 2005a; JODAR et al., 2013). Em amostras testiculares e seminais de homens inférteis foi encontrado aumento da abundância do marcador apoptótico *BCL2* (STEGER et al., 2008). Em touros, a abundância dos seguintes transcritos nos espermatozoides apresentou correlação ($P < 0,05$) com a fertilidade: *AK1* (adenilato quinase 1; $R^2 = 0,90$), *IB* (integrina $\beta 5$; $R^2 = 0,95$), *NGF* (fator de crescimento neural; $R^2 = 0,47$), *TIMP* (inibidor tecidual das metaloproteinases; $R^2 = 0,39$), *SNRPN* (*small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*; $R^2 = 0,71$) e *PLC ζ*

(fosfolipase C; $R^2=0,69$) (KASIMANICKAM et al., 2012). Da mesma forma, a análise da abundância de 24.000 transcritos revelou que 415 transcritos foram diferentemente abundantes entre espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade (FEUGANG et al., 2010). Já em garranhões, 175 transcritos foram detectados exclusivamente nos espermatozoides e não nos testículos dos reprodutores (DAS et al., 2013) mostrando que parte dos RNAs presentes no espermatozoides realmente não são remanescentes da espermatogênese e que, provavelmente, possuem alguma função nos processos reprodutivos.

Considerando a diversidade de RNAs presentes nos espermatozoides, Boerke et al. (2007) propuseram agrupar esses diferentes transcritos em quatro grupos. No primeiro grupo foram colocados os RNAs mensageiros sem função no oócito que, normalmente, são RNAs mensageiros remanescentes da espermatogênese, que não possuem função no oócito fecundado e que podem até ser deletérios ao desenvolvimento embrionário. O transcrito codificador da protamina-2 é um representante desse grupo que deve ser rapidamente degradado no zigoto (ZIYYAT; LEFÈVRE, 2001; BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007). O segundo grupo é composto por RNAs mensageiros com potencial função no oócito que são RNAs transcritos e armazenados durante a espermiogênese. O transcrito codificador *PLCζ*, produzido e armazenado na espermátide, é um exemplo de mRNA espermático importante para o desenvolvimento embrionário (BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007) que possui importante função na ativação oocitária (SAUNDERS et al., 2002). No terceiro grupo estão os RNAs mensageiros “estrangeiros” que são os transcritos espermáticos não originados dos testículos e adquiridos pelo espermatozoide durante sua passagem pelo epidídimo e pelo contato com os fluidos advindos das glândulas sexuais acessórias. O RNA mensageiro codificador da clusterina é um exemplo de transcrito importante para o desenvolvimento embrionário adquirido pelo espermatozoide durante a passagem pelo epidídimo. Normalmente o transporte destes transcritos é realizada por meio de vesículas celulares, os exossomos (SAEZ; FRENETTE, 2003; BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007; SULLIVAN; SAEZ, 2013). E, por fim, o quarto grupo constitui-se pelos RNAs de interferência que são transcritos pequenos, não codificadores de proteínas e, por isso, denominados de RNAs não codificadores (ncRNAs), que podem estar presentes nos espermatozoides e conter potencial função após a fecundação. Em relação à quantidade de transcritos presentes nos espermatozoides, os ncRNAs são descritos como o terceiro grupo de RNAs mais abundantes precedidos pelos RNAs ribossomais e pelos RNAs mitocondriais (mitoRNAs). No grupo dos ncRNAs estão os siRNA, piRNA e miRNAs sendo todos já descritos na célula espermática (SHARMA et al., 2016; ODA; SWANSON; KRAWETZ, 2018).

Os miRNAs fazem parte do grupo de ncRNAs. Estas pequenas moléculas de RNAs estão presentes em diferentes fases da espermatogênese, na maturação espermática e também na célula espermática (SHARMA et al., 2016) e assim são consideradas potenciais reguladoras da fertilidade. Os miRNAs possuem ação pós-transcricional, são muito estáveis e altamente conservados nas diferentes espécies (BARTEL, 2018). Todas estas características os tornam potentes biomarcadores de fertilidade. Ainda, miRNAs são importantes para os processos de espermatogênese, de maturação espermática (PAPAIOANNOU et al., 2009; BOUHALLIER et al., 2010; BELLEANNÉE et al., 2013; KOTAJA, 2014; BELLEANNÉE, 2015) e desenvolvimento embrionário inicial (TANG et al., 2007), sendo que alguns miRNAs já foram descritos por serem transmitidos exclusivamente pelo espermatozoide ao embrião (LIU et al., 2012).

2.2.3. miRNAs

O dogma central da biologia molecular preconiza que os genes presentes no DNA são transcritos em forma de RNAs que, por sua vez estão envolvidos no processo de tradução de proteínas (CRICK, 1970), havendo exceção para os RNAs estruturais como o RNA ribossomal (MATTICK, 2003). Entretanto, com o avanço da biologia molecular e estudos com o genoma humano, foi verificado que somente 2% de todos os genes do DNA codificam de fato proteínas (MATTICK, 2001, 2003). Além disso, muitos transcritos e regiões do DNA que eram descritos como “DNA lixo” por não codificarem proteínas e aparentemente não terem função, passaram a mostrar importante função ao codificarem moduladores pós-transcricionais (MATTICK, 2001). Neste contexto, embora já tenham sido descritos RNAs não codificadores de proteínas tais como o RNA ribossomal (RNAr) e RNA transportador (RNAt) envolvidos na síntese de proteínas, descobriu-se um grande grupo de RNAs chamados ncRNAs (RNAs não codificadores), dentre eles os miRNAs (LEE, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993).

O primeiro miRNA descrito foi *LIN-4* em *Caenorhabditis elegans*. A descoberta deste miRNA ocorreu após pesquisas mostrarem que o gene *LIN-4* era capaz de regular outro gene, o *LIN-14*. Nos estudos foi mostrado que o transcrito de *LIN-4* aumentava a sua abundância nesses parasitas conforme as transições das fases larvais. Concomitantemente, era observada diminuição da abundância da proteína LIN-14. Dessa forma, *LIN-4* foi extensivamente estudado e descoberto que esse gene estava localizado em região intrônica do DNA que até então não tinha função conhecida. Além disso, os transcritos de *LIN-4* tinham entre 22 a 61 nucleotídeos (LEE, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993). Após, somente no século 21,

foi descoberto também em *C. elegans* o segundo miRNA, o *LET-7*. Da mesma forma que *LIN-4*, *LET-7* regulava uma proteína, a LIN-41. Porém, diferentemente de *LIN-4*, *LET-7* fazia esta regulação num estágio larval mais avançado. Com a descoberta dos miRNAs, os estudos também mostraram que, além de modularem a expressão gênica, os miRNAs são moléculas altamente conservadas nas mais diversas espécies (PASQUINELLI et al., 2000; REINHART et al., 2000; BARTEL, 2018).

A descoberta dos miRNAs estabeleceu então que estas pequenas moléculas de RNA contendo aproximadamente 22 nucleotídeos eram capazes de modular a expressão gênica (BARTEL, 2004). Basicamente, a biossíntese dos miRNAs (Figura 1) é feita por meio da ação da RNA polimerase II no núcleo gerando os transcritos de miRNAs primários (pri-miRNA). Após, os pri-miRNAs que contêm uma 7-metilguanina (CAP) na extremidade 5' e são poliadenilados na extremidade 3', sofrem o *cropping* pelo complexo *Drosha*-DGCR8. Neste processo, há o corte das extremidades 3' e 5' e, assim, o pri-miRNA é convertido em miRNA precursor (pre-miRNA). Após, o pre-miRNA é transportado para o citoplasma pela proteína Exportina 5. No citoplasma, o pre-miRNA sofrerá ação da enzima *Dicer* em um segundo processo chamado de *dicing* em que a estrutura de alça (*hairpin*) do miRNA é clivada e o miRNA torna-se então um pequeno transcrito de fita dupla com cerca de 22 nucleotídeos (KIM, 2005; KIM; NAM, 2006; HA; KIM, 2014).

A fita dupla de miRNA é então transferida para proteínas do tipo Argonauta (AGO2) com suporte de proteínas do tipo chaperonas (HSC70/HSP90). Estas proteínas auxiliam a proteína Argonauta a assumir um estado de alta energia e se tornar receptiva a se ligar ao duplex de miRNA (IWASAKI et al., 2010; BARTEL, 2018). Após, ao voltar ao seu estado normal de energia e conformação, a proteína Argonauta expulsa uma das fitas de miRNA e forma o complexo RISC com a fita guia também denominada de miRNA maduro (KAWAMATA; TOMARI, 2010; BARTEL, 2018). Este complexo promove o silenciamento gênico por meio da inibição traducional ou clivagem do mRNA (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; KIM; HAN; SIOMI, 2009). A determinação da ação do miRNA se dará pelo pareamento da região *seed* do miRNA a região 3' UTR (região não traduzida) do seu transcrito alvo. Assim, se o pareamento for perfeito, processo comum em plantas, ocorrerá a clivagem do mRNA. Do contrário, ou seja, um pareamento imperfeito, implicará no bloqueio da ação da maquinaria de tradução sobre aquele mRNA sem a degradação do mesmo, processo este mais comum em animais (BARTEL, 2004).

Os miRNAs podem, ainda, agir na própria célula que o transcreveu, a célula de origem, ou em outros sítios celulares. O transporte de miRNAs pode ser realizado por meio de vesículas

extracelulares dentre elas os exossomos (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Os exossomos são descritos como um novo e importante mecanismo de comunicação celular em que uma célula, de maneira regulada, é capaz de formar corpos multivesiculares e liberá-los para o meio extracelular. Uma vez no meio extracelular, esses corpos passam a ser denominados de exossomos e são capazes de serem recebidos, de maneira regulada, por outras células (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Estas estruturas são caracterizadas por serem pequenas vesículas (40-160nm), com conteúdo altamente regulado pela célula de origem e que podem conter miRNAs, mRNAs e proteínas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; DA SILVEIRA et al., 2018). De maneira geral, pelo fato de os miRNAs interferirem no processo de tradução, estes são descritos como reguladores pós-transcricionais e apresentam importante papel nos processos fisiológicos sendo que a desregulação destes pode resultar em processos patológicos e alterações sistêmicas (HA; KIM, 2014).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da biossíntese e ação dos microRNAs

Fonte: Navarro & Monzó (2010).

Diversos miRNAs podem agir sobre um único transcrito de mRNA. Da mesma forma, um único miRNA pode ser capaz de regular diversos genes-alvo (SOOD et al., 2006). Assim, os miRNAs têm sido amplamente estudados nos processos fisiológicos e patológicos, principalmente no câncer (HA; KIM, 2014). Nos processos reprodutivos, miRNAs têm sido associados com qualidade oocitária (FENG et al., 2015; DEL COLLADO et al., 2017), viabilidade e sucesso gestacional (DE BEM et al., 2017) e desenvolvimento embrionário inicial (TANG et al., 2007). Além disso, essas moléculas têm mostrado ter grande importância na regulação da espermatogênese (KOTAJA, 2014; WANG; XU, 2014; LUO et al., 2015) e na maturação espermática durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo (NI et al., 2011; BELLEANNÉE et al., 2013; BELLEANNÉE, 2015).

2.2.3.1. miRNAs e espermatogênese

A espermatogênese consiste em um processo finamente regulado e altamente complexo de multiplicação e diferenciação celular em que uma célula diploide relativamente indiferenciada, a espermatogônia, se diferencia de maneira lenta e regulada em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide (SHARMA; AGARWAL, 2011; STAUB; JOHNSON, 2018). Por ser de alta complexidade, este processo é dividido em três outros processos: a espermatocitogênese (também chamada de fase de proliferação), a meiose e a espermiogênese (também chamada de fase de diferenciação) (STAUB; JOHNSON, 2018). Para que a espermatogênese ocorra corretamente, há fina regulação endócrina realizada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. A hipófise, estimulada pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), sintetizado e armazenado no hipotálamo, sintetiza e secreta o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH), que interagem respectivamente com as células de Leydig e Sertoli localizadas nos testículos. As células de Leydig, localizadas externamente aos túbulos seminíferos, são responsáveis pela produção de testosterona que atuará sobre a espermatogênese por intermédio das células de Sertoli. As células de Sertoli, por sua vez, possuem papel essencial principalmente nas fases de meiose e na espermiogênese (RUWANPURA; MCLACHLAN; MEACHEM, 2010); estas estão localizadas no epitélio seminífero e secretam fatores que dão suporte e nutrição às células espermáticas possibilitando que ocorra proliferação e desenvolvimento (SOFIKITIS et al., 2008; SHARMA; AGARWAL, 2011).

Basicamente, durante a espermatocitogênese ocorre a proliferação das espermatogônias em diferentes tipos de espermatogônias (A0, A1, A2, A3, A4, Intermediária e

B) que ao final geram os espermátócitos primários caracterizando o início da fase meiótica. Na fase meiótica, os espermátócitos primários, por sua vez, sofrerão a primeira divisão meiótica produzindo os espermátócitos secundários que sofrerão a segunda divisão meiótica e gerarão as espermátides redondas. Por fim, durante a espermiogênese, as espermátides redondas irão se diferenciar em espermátides alongadas e, finalmente, em espermatozoides, que serão liberados no lúmen do epitélio seminífero no processo denominado de espermição (STAUB; JOHNSON, 2018). Todo esse processo de multiplicação e diferenciação celular é finamente regulado por ações hormonais e fatores secretados principalmente pelas células de Sertoli (SOFIKITIS et al., 2008) que culminam na expressão de genes específicos e essenciais em cada etapa da espermatogênese (JAN et al., 2012)

O perfeito funcionamento das células de Sertoli se faz então essencial para que ocorra a espermatogênese. Camundongos *knock-out* especificamente nas células de Sertoli para a enzima de processamento de miRNAs, a *Dicer*, mostram que os animais tornam-se inférteis com ausência de espermatozoides no lúmen do epitélio seminífero e distúrbios na espermatogênese (PAPAIIOANNOU et al., 2009). Em suínos, o miR-26a é capaz de inibir a proliferação e promover a apoptose de células de Sertoli afetando consequentemente a espermatogênese nesta espécie (RAN et al., 2018). Além disso, cada tipo celular presente no epitélio seminífero possui um perfil diferente de miRNAs que possuem função importante nos processos de proliferação e diferenciação celular (HAYASHI et al., 2008; SONG et al., 2009; SMORAG et al., 2012; CHEN et al., 2017).

A ação dos miR-221, miR-203 e das famílias do miR-290 e do miR-34 sobre diferentes células do epitélio seminífero parece estar envolvida num processo de regulação fino da espermatogênese (SMORAG et al., 2012). Smorag et al. (2012) mostraram que a ação do miR-221 e da família do miR-290 sobre a maquinaria gênica, dentre eles sobre o transcrito *C-KIT*, regula o processo de proliferação das células-tronco espermatogônias em diferentes tipos de espermatogônias e espermátócitos primários. Os autores também mostraram que os espermátócitos primários sofrem o processo de meiose e formam os espermátócitos secundários sob regulação, dentre outros fatores, do miR-203. Por fim, durante a fase meiótica em que há formação das espermátides redondas, os autores mostraram que há ação da família dos miR-34 (SMORAG et al., 2012). Em humanos e suínos, esta família de miRNA também possui importância na regulação da espermatogênese (BOUHALLIER et al., 2010; WANG et al., 2018). Dessa forma, os miRNAs são importantes reguladores da espermatogênese por meio da regulação de transcritos importantes. A ausência de miRNAs durante a espermatogênese resulta em distúrbios no processo e consequentemente em infertilidade.

2.2.3.2. miRNAs e maturação espermática

Após o espermatozoide ser produzido nos testículos, essa célula será armazenada no epidídimo, onde passará pelas diferentes porções deste órgão. O epidídimo, um órgão todo contorcido que possui cerca de 6 metros em humanos (VON; NEUHAEUSER, 1964; HINTON et al., 2011) e chega até 80 metros em garanhões (MANEELY, 1959), é responsável por fazer a transição dos espermatozoides recém-saídos do epitélio seminífero testicular por meio dos ductos eferentes para os ductos deferentes que desembocarão na uretra. O epidídimo é dividido em basicamente três segmentos: cabeça, corpo e cauda; e em algumas espécies tais como os camundongos, pode-se distinguir uma quarta porção, o segmento inicial (SULLIVAN et al., 2005; HINTON et al., 2011). Pela diferente função e expressão gênica de cada segmento, o epidídimo pode ser considerado formado por três ou quatro diferentes órgãos podendo ser considerado cada segmento um órgão (DOMENICONI et al., 2016).

A passagem pelo epidídimo é crucial para que o espermatozoide adquira motilidade e torne-se capaz de fecundar o ócito. De maneira geral, espermatozoides coletados da cabeça do epidídimo são incapazes de fecundar. Após a passagem pela cauda do epidídimo, onde os espermatozoides podem ficar armazenados por até 15 dias, estes são capazes de fecundar e possuem motilidade (SULLIVAN et al., 2005). Durante a passagem pelos diferentes segmentos, os espermatozoides entram em contato com diferentes repertórios de transcritos e proteínas que são transmitidos do epitélio do epidídimo para os espermatozoides, principalmente, por meio das vesículas exossomais presentes nos diferentes segmentos do epidídimo (SULLIVAN et al., 2005; SULLIVAN; FRENETTE; GIROUARD, 2007; FRENETTE et al., 2010; D’AMOURS et al., 2012; BELLEANNÉE et al., 2013; SULLIVAN, 2015).

Em estudos com camundongos *knock-out* especificamente no epidídimo para a enzima *Dicer* foi observada regressão na diferenciação das células do epidídimo sendo essa enzima fundamental para a manutenção do epitélio epididimário (BJÖRKGREN et al., 2012). Da mesma forma, camundongos *knock-out* especificamente nas células principais do epitélio epididimário para a enzima *Dicer* apresentaram desregulação da expressão de genes (JERCZYNSKI et al., 2016). Sendo assim, os miRNAs atuam de maneira importante sobre as células presentes no epitélio epididimário e, possuem consequentemente potencial papel em participar da regulação da maturação espermática e da fertilidade.

Neste sentido, de fato a regulação dos miRNAs no epitélio epididimário se torna importante também para o espermatozoide, visto que durante a passagem pelo epidídimo, o

espermatozoide recebe informações deste órgão (SULLIVAN et al., 2005). Essas informações são transmitidas do epitélio do epidídimo ao espermatozoide por meio dos epididiossomos, vesículas extracelulares presentes no epidídimo, que transportam moléculas, dentre elas os miRNAs (BELLEANNÉE et al., 2013). Os epididiossomos apresentam diferentes repertórios de miRNAs ao longo dos diferentes segmentos epididimários em touros e humanos (BELLEANNÉE et al., 2013; BELLEANNÉE, 2015) e são capazes de transmitir moléculas de miRNAs aos espermatozoides (REILLY et al., 2016; SHARMA et al., 2018). As moléculas transmitidas pelo epididiossomos para os espermatozoides ao longo do epidídimo possuem função na fertilidade e no desenvolvimento embrionário inicial (CONINE et al., 2018).

Em camundongos, o perfil de miRNAs presentes no espermatozoide é alterado ao longo do epidídimo mostrando que os espermatozoides possuem regulação do conteúdo de miRNAs mesmo após o processo de espermatogênese (NIXON et al., 2015). Os miRNAs miR-208b-3p e miR-196b-5p parecem ser acumulados pelo espermatozoide durante a passagem pela cauda do epidídimo, enquanto que os miR-204b-5p e miR-375-3p parecem ser acumulados durante a passagem pela cabeça e corpo do epidídimo (REILLY et al., 2016). No tocante aos epididiossomos presentes na cabeça e na cauda do epidídimo, também há diferentes perfis de miRNAs; os miR-143, -145, -199 e -214 são mais abundantes em epididiossomos presentes na cabeça do epidídimo de touros, enquanto que os miR-395, -654 e -1224 são mais abundantes em epididiossomos presentes na cauda do epidídimo (BELLEANNÉE et al., 2013). Em homens com alterações reprodutivas, miRNAs presentes no plasma seminal (miR-34c-5p, -122, -146b-5p, -181a, -374b, -509-5p e -513a-5p) apresentaram diminuição da abundância em homens com azoospermia (ausência de espermatozoides no ejaculado) e aumento da abundância em homens com astenozoospermia (diminuição da motilidade espermática) (WANG et al., 2011). Da mesma forma, a investigação de miRNAs presentes nos exossomos do plasma seminal possibilita que seja diagnosticada a origem da falha da espermatogênese (BARCELÓ et al., 2018). No caso de homens azoospermicos, esse distúrbio pode ocorrer por falha na espermatogênese ou por obstrução no trato genital estando a espermatogênese preservada. Normalmente, o diagnóstico da origem da azoospermia é feito realizando-se a biópsia testicular. No entanto, estudo recente mostrou que um miRNA, o miR-31-5p, localizado nos exossomos do plasma seminal, possui alta sensibilidade e especificidade em detectar a origem do distúrbio (BARCELÓ et al., 2018). No entanto, apesar de estudos mostrarem a importância dos miRNAs ao longo do epidídimo tanto em relação ao aspecto epitelial quanto luminal, são necessários mais estudos que mostrem de fato como os miRNAs são capazes de regular a maturação

espermática durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo e também regular a aquisição de motilidade e a capacidade do espermatozoide em se tornar fértil.

2.2.3.3. miRNAs e desenvolvimento embrionário

Após o espermatozoide passar pelo epidídimo, a sua trajetória final consiste em alcançar a tuba uterina e encontrar o oócito na região da ampola para então fecundá-lo. Para que a fecundação de fato ocorra, é necessário que o espermatozoide passe pelo processo de capacitação espermática que ocorre de maneira fisiológica durante a sua passagem pelo trato reprodutivo da fêmea (OHTO et al., 2016). Neste processo, de maneira geral, ocorre o efluxo de colesterol que culmina com a retirada de colesterol da membrana plasmática da célula espermática tornando a membrana fluida e permeável aos íons bicarbonato e cálcio. Isso leva ao aumento da concentração de bicarbonato e cálcio intracelulares, além da hiperpolarização da membrana plasmática, atividade de proteínas quinases e aumento da concentração intracelular de AMP cíclico (BREITBART, 2002; VISCONTI, 2009; VISCONTI et al., 2011). Apesar de mais estudos serem necessários para entender melhor o processo de capacitação espermática, durante esse processo ocorre a hiperativação espermática e a reação acrossomal, processos necessários para que o espermatozoide ultrapasse a barreira formada pelas células do *cumulus oophorus* que circundam o oócito (VISCONTI et al., 2011). Por fim, ao ultrapassar a barreira formada por estas células, o espermatozoide encontra uma barreira de natureza glicoproteica que circunda o oócito, a zona pelúcida. A zona pelúcida e o espermatozoide interagem por meio de um complexo de adesão formado por uma proteína da família das imunoglobulinas localizada na membrana espermática, a IZUMO1, com seu receptor localizado na zona pelúcida, JUNO (BIANCHI et al., 2014). Esta interação juntamente com o influxo de cálcio promovido pela entrada do espermatozoide no oócito faz com que a zona pelúcida fique não receptiva a outros espermatozoides e que o oócito retome e progrida na meiose possibilitando a formação dos pró-núcleos e singamia (PERECIN et al., 2007; BIANCHI et al., 2014).

Uma vez formado o embrião, este será dependente dos transcritos transmitidos principalmente pelo oócito, mas também pelo espermatozoide, até que ele seja capaz de transcrever seus próprios transcritos na fase denominada de ativação do genoma embrionário. Em bovinos, a ativação do genoma embrionário ocorre no estágio de 8 a 16 células; em camundongos, ocorre no estágio de 2 células; e em humanos e suínos ocorre no estágio de 4 a 8 células (BRAUDE; BOLTON; MOORE, 1988; SIRARD, 2012; GRAF et al., 2014a, 2014b).

Sendo assim, até o estágio em que há ativação do genoma embrionário, o embrião é dependente dos transcritos entregues pelos gametas.

Os miRNAs também são entregues pelos gametas aos embriões sendo que, até a ativação do genoma embrionário, ocorre a diminuição da abundância de transcritos de miRNAs presentes no embrião aumentando após a ativação (TANG et al., 2007). Embriões murinos produzidos a partir de oócitos *knock-out* para a enzima *Dicer* não progrediram na primeira divisão celular mostrando a importância dos miRNAs entregues pelo gameta feminino no desenvolvimento embrionário inicial (TANG et al., 2007). Da mesma forma, embriões murinos gerados com oócitos normais e espermatozoides produzidos por meio de células espermatogênicas *knock-out* para as enzimas *Dicer* ou *Drosha* tiveram suas taxas de desenvolvimento diminuídas. No entanto, quando foram utilizados os mesmos espermatozoides acrescidos de miRNAs presentes nos espermatozoides dos camundongos sem a mutação, as taxas de desenvolvimento foram recuperadas (YUAN et al., 2016). Ainda, a inibição do miR-34c, que é entregue exclusivamente pelo espermatozoide ao embrião em camundongos (LIU et al., 2012), mas não em bovinos (TSCHERNER et al., 2014), impede que ocorra a primeira divisão celular embrionária em camundongos (LIU et al., 2012). O miR-449b, também transmitido do espermatozoide ao embrião, quando estimulado a ser expresso em embriões bovinos clonados resulta em maiores taxas de clivagem no estágio de 8 células e menores taxas de apoptose no blastocisto (WANG et al., 2017).

Sendo assim, apesar de haver queda dos níveis de miRNAs até a ativação do genoma embrionário, há dependência dos embriões pelos miRNAs entregues pelos gametas. Alguns miRNAs entregues pelos gametas e, surpreendentemente, pelo espermatozoide podem influenciar o desenvolvimento e a qualidade embrionária. Assim, a presença destes miRNAs nesta fase inicial pode estar modulando o desenvolvimento embrionário nas fases seguintes.

2.2.3.4. miRNAs e epigenética

Muitos estudos também têm mostrado que os miRNAs transmitidos pelos espermatozoides podem possuir algum efeito sobre a prole, podendo ser de certa forma considerados como mecanismos epigenéticos. Os mecanismos epigenéticos podem ser definidos como fatores herdáveis que alteram o fenótipo do indivíduo sem alterar a sequência do DNA (WEINHOLD, 2006). Na Ciência, ainda não há um consenso sobre o papel epigenético dos miRNAs. No entanto, muitos estudos têm mostrado com grande excelência que os miRNAs estão envolvidos com mecanismos epigenéticos.

Em estudo publicado recentemente na revista *Cell Reports*, camundongos foram submetidos ao enriquecimento ambiental nas gaiolas em que foram criados e apresentaram diferente perfil de miRNAs espermáticos em relação a camundongos que foram criados em gaiolas sem enriquecimento (grupo controle). Em seguida, os pesquisadores constataram que os filhos dos camundongos submetidos ao enriquecimento apresentaram maior atividade cognitiva. Do contrário, os filhos nascidos de pais que não foram submetidos ao enriquecimento, apresentaram menor atividade cognitiva. Os pesquisadores identificaram então os miRNAs espermáticos miR-212/132 que poderiam estar envolvidos neste efeito e estavam presentes nos espermatozoides dos camundongos submetidos ao enriquecimento. Assim, a inibição destes miRNAs na produção de embriões com os espermatozoides dos pais submetidos ao enriquecimento foi realizada. Eles notaram então que a prole provinda destes embriões em que os miR-212/132 foram inibidos, mas que foi produzida com espermatozoides dos camundongos submetidos ao enriquecimento, apresentou atividade cognitiva semelhante ao grupo controle mostrando que provavelmente o efeito advindo do enriquecimento dos pais estava relacionado com miRNAs entregues pelo espermatozoide (BENITO et al., 2018). Da mesma forma, Rodgers et al. (2015) identificaram nove miRNAs que tiveram a abundância alterada nos espermatozoides de camundongos submetidos ao estresse crônico. Surpreendentemente, a injeção destes nove miRNAs em embriões de pais não estressados recapitulou os efeitos observados nos pais submetidos ao estresse crônico (RODGERS et al., 2015). Esses estudos mostram que os miRNAs possuem potencial em serem considerados como mecanismos epigenéticos e que os miRNAs transmitidos pelo espermatozoide particularmente parecem ter grande envolvimento nestes mecanismos. No entanto, mais estudos são necessários para explicar como os miRNAs podem ter ação sobre a prole e qual o mecanismo de preservação deste ao longo das gerações. Há muitos grupos de pesquisa extremamente competentes realizando essas investigações.

2.2.3.5. miRNAs, qualidade espermática e fertilidade masculina

Pelo fato dos miRNAs possuírem papel importante nos processos fisiológicos relacionados à espermatogênese, maturação espermática e desenvolvimento embrionário inicial espera-se que estas moléculas sejam capazes de regular a fertilidade. Assim, diferentes perfis de miRNAs têm sido associados com diferentes fenótipos de fertilidade tanto em humanos quanto em animais (ABU-HALIMA et al., 2014b; FAGERLIND et al., 2015).

Em humanos, o perfil de miRNAs espermáticos de homens férteis e inférteis acompanhado ou não de alterações espermáticas morfofuncionais tem sido amplamente investigado. Em homens com distúrbios reprodutivos foi observado perfil de miRNAs espermáticos diferente comparado a homens que não apresentaram distúrbios reprodutivos. Neste estudo, homens com quadro de astenozoospermia, isto é, diminuição da motilidade espermática, apresentaram alta abundância de 50 miRNAs espermáticos e baixa abundância de 27 miRNAs espermáticos em relação a homens sem alterações espermáticas (normozoospermia); os miR-34b, -122 e -1973 foram os mais abundantes nos homens com astenozoospermia. Já nos espermatozoides de homens com quadro de oligoastenozoospermia, isto é, baixa concentração espermática e diminuição da motilidade espermática, 42 miRNAs apresentaram alta abundância e 44 apresentaram baixa abundância em relação aos miRNAs espermáticos de homens normozoospermicos; os miR-15b, -16, -19a, -34b, -34c-5p, -122, -449a e -1973 foram os mais abundantes nos homens com oligoastenozoospermia (ABU-HALIMA et al., 2013). Já o perfil de miRNAs de espermatozoides de homens que apresentaram qualidade do sêmen normal (normozoospermicos) mas que tinham desempenho diferente de fertilidade (férteis x inférteis) mostrou que 57 miRNAs apresentaram abundância diferente entre os grupos. Estes miRNAs, dentre eles os miR-15b-5p e 34a-5p, foram relacionados com vias ligadas ao desenvolvimento embrionário e remodelamento da cromatina (SALAS-HUETOS et al., 2016).

Em animais, os miRNAs também foram associados com diferentes fenótipos de fertilidade. Touros da raça Holandesa com qualidade espermática satisfatória e histórico de fertilidade distinto (alta e baixa fertilidade), apresentaram perfis diferentes de miRNAs espermáticos. Neste estudo sete miRNAs foram identificados com abundância distinta entre os grupos: miR-3155, -6125, -6727, -8197, -11796, -13659 e -14189 (GOVINDARAJU et al., 2012). Em outro estudo, também avaliando miRNAs em espermatozoides de touros da raça Holandesa com diferentes taxas de fertilidade a campo, notou-se que sete miRNAs (miR-19b-3p, -27a-5p, -34c-3p, -148b-3p, -320a, -502-5p e -1249) apresentaram maior abundância no grupo de baixa fertilidade (FAGERLIND et al., 2015).

Por fim, os miRNAs presentes nos espermatozoides também têm sido associados com a qualidade espermática. Em cachacos com baixa qualidade espermática, caracterizada por baixa motilidade e alta porcentagem de células anormais, constatou-se que de 10 miRNAs avaliados, quatro (let-7a, let-7d, let-7e e miR-22) apresentaram abundância aumentada e um (miR-15b) apresentou abundância diminuída nos espermatozoides (CURRY; SAFRANSKI; PRATT, 2011). Da mesma forma, Capra et al. (2017) separando espermatozoides com alta e

baixa motilidade da mesma dose de sêmen criopreservado de touros mostraram que as duas subpopulações espermáticas apresentavam perfis diferentes de miRNAs espermáticos. Neste estudo, os miRNAs miR-17-5p, -20a-5p, -26a-5p, -122-5p, -184 e -486-5p foram diferentemente detectados entre as duas subpopulações (CAPRA et al., 2017).

Assim, a partir dos resultados destes estudos que mostram os diferentes perfis de miRNAs entre fenótipos de fertilidade e qualidade de sêmen distintos, podemos notar que os miRNAs presentes nos espermatozoides são regulados pelos processos de espermatogênese e maturação espermática e que, de alguma forma, estes miRNAs presentes nos espermatozoides possuem impacto sobre as taxas de fertilidade e sobre o sucesso reprodutivo.

2.3. Considerações finais

Conforme exposto nesta revisão, os atributos morfofuncionais da célula espermática nem sempre são suficientes em predizer o potencial fértil da amostra espermática. Com base nessas avaliações morfofuncionais, muitas vezes amostras espermáticas qualificadas com bom potencial fértil, apresentam taxas de fertilidade aquém do esperado. Assim, novas abordagens da fertilidade masculina são necessárias em que se investiguem outros atributos espermáticos.

Neste contexto, os miRNAs, pequenas moléculas de RNAs, altamente estáveis e capazes de modular a expressão gênica interferindo na tradução de proteínas, possuem grande potencial em atuarem como biomarcadores de fertilidade. A regulação feita por estas moléculas é extremamente fina e envolve mecanismos ainda não totalmente compreendidos pela Ciência. No entanto, é evidente que os miRNAs possuem papel fundamental na espermatogênese, na maturação espermática e também no desenvolvimento embrionário inicial. Dessa forma, os miRNAs ganham cada vez mais destaque como potenciais biomarcadores de fertilidade e, principalmente, como moléculas promissoras envolvidas nas causas atualmente descritas como idiopáticas que levam à infertilidade masculina. Com estas descobertas, os miRNAs têm grande potencial em serem utilizados na identificação de amostras com baixo potencial fértil. Ademais, pode-se especular que no futuro, descobrindo-se o mecanismo de ação dessas moléculas sobre a fertilidade, elas podem vir a serem utilizadas como terapias para o incremento do potencial fértil dessas amostras. Assim, acreditamos que a descoberta dessas moléculas seja o início do entendimento dos mecanismos finos que regulam a fertilidade masculina e o grande marco para a introdução de terapias inovadoras para os casos de infertilidade e subfertilidade masculina.

3. CAPÍTULO 2: “ESPERMATOZOIDES DE TOUROS DE ALTA E BAIXA FERTILIDADE CONTRIBUEM COM NÍVEIS DIFERENTES DE MIR-216B AO EMBRIÃO REGULANDO DE MANEIRA DIFERENTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL”

3.1. Introdução

O sucesso da fertilidade em bovinos depende de fatores relacionados aos machos, às fêmeas e às biotécnicas reprodutivas empregadas, sendo a qualidade do sêmen um dos fatores mais importantes dentre aqueles ligados ao macho (VINCENT et al., 2012). No entanto, para que a fecundação ocorra com êxito, o espermatozoide, uma célula altamente especializada, precisa apresentar diversos atributos relacionados com a sua habilidade em: 1) alcançar a tuba uterina; 2) fecundar o oócito; e 3) contribuir com o desenvolvimento embrionário inicial (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993; KRAWETZ, 2005). Para atender a todos esses aspectos, o método de eleição para mensurar a fertilidade de touros consiste no emprego das amostras espermáticas em programas de inseminação artificial a campo avaliando-se a taxa de prenhez (ZHANG et al., 1999; ARRUDA et al., 2011). No entanto, pelos altos custos e longo tempo para obtenção dos resultados, a execução desta prática muitas vezes se torna inviável. Assim, é desejável que se encontre características espermáticas que apresentem alta correlação com a fertilidade.

Embora a busca por características espermáticas que possuam alta correlação com a fertilidade represente um grande desafio, este tem sido o objetivo de diversos grupos de pesquisa. Oliveira et al. (2014) mostraram que a porcentagem de espermatozoides com integridade de membranas plasmática, acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial foi eficiente em distinguir partidas com alto potencial fértil. No entanto, Sellem et al. (2015) encontraram baixa correlação dessas características espermáticas com a fertilidade. Além das características espermáticas inerentes à qualidade, o espermatozoide precisa ter ainda a habilidade em entregar fatores importantes ao embrião, tais como os centríolos, RNAs e proteínas, contribuindo com mais que o DNA ao embrião (KRAWETZ, 2005; ODIA; SWANSON; KRAWETZ, 2018). Os miRNAs (microRNAs) de origem espermática também parecem ser fatores importantes determinantes da fertilidade a serem entregues pelo espermatozoide ao embrião (LIU et al., 2012; YUAN et al., 2016; CONINE et al., 2018).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNAs contendo cerca de 22 nucleotídeos que modulam a expressão gênica interferindo no processo de tradução de proteínas (BARTEL,

2018). Essas pequenas moléculas foram descritas pela primeira vez em espermatozoides em 2005b por Ostermeier et al. e, atualmente, se sabe que possuem papel fundamental sobre a espermatogênese, maturação espermática e desenvolvimento embrionário inicial (TANG et al., 2007; BELLEANNÉE et al., 2013; KOTAJA, 2014; JERCZYNSKI et al., 2016; YUAN et al., 2016). Embora em bovinos não tenha sido descrito o mesmo mecanismo (TSCHERNER et al., 2014), em camundongos, o espermatozoide é capaz de transmitir ao embrião o miR-34c que possui papel importante sobre a clivagem inicial; na ausência deste miRNA, há disfunção no desenvolvimento embrionário inicial com prejuízo na taxa de primeira clivagem (LIU et al., 2012). Da mesma forma, o miR-449b também transmitido do espermatozoide ao embrião, apresenta papel importante sobre as taxas de primeira clivagem desta espécie (WANG et al., 2017). Assim, além da contribuição com o DNA, componentes celulares e proteínas específicas, os espermatozoides vem ganhando destaque em contribuir também com moléculas de RNAs e miRNAs para o desenvolvimento embrionário inicial.

Embora seja cada vez mais evidente de que espermatozoides entregam e contribuem com miRNAs para o desenvolvimento embrionário inicial, ainda não se sabe por quais mecanismos estes regulam a fertilidade. Dessa forma, este estudo, valendo-se do modelo de touros de alta e de baixa fertilidade diagnosticados a campo, buscou encontrar miRNAs que apresentassem diferentes níveis de abundância entre amostras espermáticas destes touros e entender como esses miRNAs poderiam regular a fertilidade. Com este objetivo, o estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro experimento foi investigada a diferença de perfil de miRNAs espermáticos de partidas de touros de alta e baixa fertilidade que apresentassem características morfofuncionais espermáticas semelhantes. Em seguida, o perfil de miRNAs foi pesquisado nos embriões. Neste experimento foi encontrado um miRNA, o miR-216b, com abundância diferente entre espermatozoides e embriões dos touros de alta e baixa fertilidade. Os genes-alvo deste miRNA e os seus mecanismos de regulação foram pesquisados nos embriões. O segundo experimento deste estudo teve por objetivo mostrar se, de fato, o miR-216b é entregue pelo espermatozoide ao embrião. Para isso, utilizou-se um modelo baseado nas taxas de polispermia. Com base no melhor do nosso conhecimento, o uso deste modelo para mostrar esse mecanismo nunca foi reportado antes na literatura científica.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Reagentes

Quando não mencionada a origem, as soluções e reagentes químicos utilizados foram provenientes da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As sondas fluorescentes utilizadas para a análise espermática foram: Hoescht 33342 (HOE 33342; código H1399, Thermo Fisher Scientific); iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma-Aldrich); iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1; T3168, Thermo Fisher Scientific); aglutinina obtida de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA; L0770, Sigma-Aldrich); CellROX™ Deep Red (C10422, Thermo Fisher Scientific); SYTO™ 59 Red (SYTO-59, S11341, Thermo Fisher Scientific); lectina obtida de *Arachis hypogaea* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PNA, L7381, Sigma-Aldrich), MitoSOX™ Red (MitoSOX, M36008 Thermo Fisher Scientific), iodeto de YO-PRO™-1 (YP, Y3603, Thermo Fisher Scientific) e C11-BODIPY™ 581/591 (BODIPY, D3861, Thermo Fisher Scientific).

3.2.2. Declaração de ética

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados de acordo com os princípios éticos de pesquisa animal adotados pela “Comissão de Ética no Uso de Animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) sob o número 1912050516.

3.2.3. Experimento 1

3.2.3.1. Esquema experimental

Para este experimento, foram utilizadas partidas comerciais de sêmen criopreservado de touros da raça Aberdeen Angus (*Bos taurus*) de histórico de fertilidade *in vivo* conhecida. Os dados retrospectivos de fertilidade dos touros foram obtidos por meio de parceria com a empresa Alta Genetics® (Uberaba, Brasil). As informações de prenhez a campo dos touros são reunidas em banco de dados da empresa no programa *Concept Plus Corte*®. Este programa, por meio de análise estatística avançada, avalia o desempenho dos touros em programas de

inseminação artificial em tempo fixo (IATF) realizados em diferentes rebanhos por diferentes técnicos. Com esses dados, os touros são divididos em grupos com diferentes taxas de fertilidade.

Para o experimento, foram utilizadas partidas de sêmen de touros que apresentaram fertilidade a campo distinta ($P=0,007$). Os grupos formados foram de touros de alta fertilidade (AF; $n=3$; $54,3\pm 1\%$) e touros de baixa fertilidade (BF; $n=3$; $41,5\pm 2,3\%$). Os touros de alta fertilidade foram avaliados em 396 rebanhos diferentes, sendo realizados 52.259 serviços com as partidas destes touros. Os touros de baixa fertilidade foram avaliados em 22 rebanhos diferentes, sendo realizados 3.405 serviços com as partidas destes touros. Para a realização do experimento, em um primeiro momento, três partidas de cada touro ($n=18$) foram submetidas às avaliações espermáticas convencionais e funcionais. Em seguida, com base nestas avaliações, selecionou-se uma partida de cada touro ($n=6$) e essas partidas foram utilizadas para as análises espermáticas moleculares e para a produção *in vitro* de embriões em que se avaliou a taxa de blastocistos e se coletou embriões para as análises moleculares.

As atividades relacionadas à avaliação da qualidade espermática foram realizadas no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos “Prof. Dr. Aníbal de Sant’Anna Moretti” (LATES) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As atividades experimentais relacionadas às avaliações moleculares e produção *in vitro* de embriões foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

3.2.3.2. Avaliações espermáticas morfofuncionais: convencionais e funcionais

Para as avaliações espermáticas morfofuncionais, as 18 partidas de sêmen foram analisadas em duplicata pelo mesmo técnico. Para a avaliação, foram descongeladas duas palhetas de sêmen de cada partida de modo a diminuir o efeito individual da palheta. As palhetas de sêmen foram todas descongeladas sob as mesmas condições: em banho-maria a 37 °C por 30 segundos.

As avaliações espermáticas morfofuncionais foram divididas em análises espermáticas convencionais e funcionais. As análises convencionais realizadas foram: motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. As análises funcionais realizadas foram: características da motilidade espermática pelo sistema computadorizado de avaliação da motilidade (CASA); integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial pela

microscopia de fluorescência e citometria de fluxo; produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo; e peroxidação lipídica por citometria de fluxo.

3.2.3.2.1. Avaliações espermáticas convencionais

a. Motilidade espermática e vigor espermático

As avaliações subjetivas da motilidade espermática total (%) e do vigor espermático (escore 1-5; sendo 1 o movimento exclusivamente oscilatório e 5 o movimento progressivo retilíneo e muito rápido) foram realizados por um único técnico por meio de microscopia de contraste de fase (Modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão), em aumento de 100x sem diluição prévia do sêmen.

b. Concentração espermática

A concentração espermática foi avaliada por meio da técnica da câmara de Neubauer utilizando prévia diluição (1:100) em solução salina tamponada contendo 4% de formaldeído. Para isso, foram adicionados 10 µL de sêmen a 990 µL desta solução. Em seguida, foi montada a câmara e a contagem dos espermatozoides foi realizada em aumento de 400x em microscopia de contraste de fase (Modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão). Respeitou-se a diluição prévia para o cálculo da concentração de espermatozoides.

c. Morfologia espermática

A amostra espermática foi fixada em solução salina tamponada contendo 4% de formaldeído previamente aquecida a 37° C. Para a avaliação da morfologia espermática, foram analisadas 200 células pela técnica da câmara úmida, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 1.000x. As células foram classificadas de acordo com Blom (1973) em porcentagem de defeitos espermáticos maiores [defeitos de acrossomo; gota protoplasmática proximal; teratológicas; *pouch formation*; defeitos de cabeça (subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal e contorno anormal); defeitos de peça intermediária; defeitos de cauda (enrolada na cabeça, fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota)],

defeitos menores [gota protoplasmática distal, defeitos de cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal); inserção da cauda anormal (oblíqua, retroaxial e abaxial)] e defeitos totais (soma dos maiores e menores).

3.2.3.2.2. Avaliações espermáticas funcionais

a. Características da motilidade avaliadas pelo sistema computadorizado

As características da motilidade foram avaliadas pelo sistema computadorizado de motilidade (CASA) pelo programa SCA (*Sperm Class Analyser*; Microptic, Barcelona, Espanha). O *setup* foi previamente ajustado para análise de espermatozoides bovinos (Área da partícula: 15 a 70 μm^2 ; espermatozoides rápidos: VAP (velocidade do trajeto) $>40 \mu\text{m/s}$; motilidade progressiva: STR (retilinearidade) $>70\%$; movimento circular: LIN (linearidade) $<50\%$; pontos de VAP: 5; números de imagens capturadas: 30; imagens por segundo: 50). Para a avaliação, 10 μL da amostra espermática diluída a 10×10^6 espermatozoides/mL em meio TALP *sperm* (4,2 mg/mL de cloreto de sódio, 1,87 mg/mL de cloreto de potássio, 2,1 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 $\mu\text{g/mL}$ de fosfato de sódio, 290 $\mu\text{g/mL}$ de cloreto de cálcio monohidratado, 80 $\mu\text{g/mL}$ de cloreto de magnésio hexahidratado, 6,5 mg/mL de Hepes) suplementado com albumina, lactato de sódio, piruvato de sódio e penicilina-estreptomicina (BAVISTER; LORRAINE, 1983) foi inserida na câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) que foi utilizada para a avaliação. As características da motilidade avaliadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPRO, %), porcentagem de células rápidas (RAP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e frequência de batimento (BCF, Hz).

b. Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela microscopia de fluorescência

Para as análises em microscopia de fluorescência, foi utilizado o microscópio de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e

emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial por microscopia de fluorescência, a concentração espermática foi ajustada para 10×10^6 espermatozoides/mL em meio TALP *sperm*. Em seguida, foi adicionado ao volume de 150 μ L do sêmen diluído, 2 μ L de HOE 33342 0,5 mg/mL, 2 μ L de IP 0,5 mg/mL, 6 μ L de JC-1 153 μ M e 20 μ L de FITC-PSA 100 μ g/mL. Após a adição das sondas fluorescentes, as amostras foram incubadas por 8 minutos a 37° C. Em seguida, foram montadas as lâminas e foram avaliadas 200 células por amostra, sendo classificadas de acordo com a fluorescência emitida em: porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (células PIAIA), porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra e porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial adaptado de Celeghini et al. (2008).

Para a avaliação da produção de espécies reativas ao oxigênio pelo espermatozoide pela microscopia de fluorescência, foi utilizada a sonda CellROX Deep Red® (ALVES et al., 2015) sendo adicionado 1,2 μ L de CellROX™ Deep Red 2,5 mM e 2 μ L de HOE 33342 0,5 mg/mL a 150 μ L de sêmen diluído em TALP (10×10^6 espermatozoides/mL). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37° C. Ao final, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 600g e ressuspensas em meio TALP. Em seguida, as lâminas foram montadas e foram classificadas 200 células por amostra de acordo com a fluorescência emitida. Assim, as células foram classificadas em porcentagem de espermatozoides positivos (Red+) para a presença de ROS quando a peça intermediária aparecia em tonalidades de vermelho.

- c. Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica espermática

Para todas as avaliações por citometria de fluxo foi utilizado o aparelho BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, São José, CA, EUA) configurado com dois lasers (azul: 488nm; e vermelho: 635nm) com capacidade de análise simultânea de até seis características sendo estas SSC (*Side Scatter*: granulidade celular), FSC (*Forward Scatter*: tamanho celular) e quatro cores pelos diferentes filtros (FL1: 533/30nm; FL2: 585/40nm; FL3: >670nm; e FL4: 675/25nm). Antes da avaliação das amostras, foi realizada a compensação manual de acordo

com Andrade (2009) com o objetivo de minimizar a sobreposição de fluorescência e determinar a localização das diferentes subpopulações espermáticas. Para as leituras de integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica foram adicionados controles positivos de acordo com Florez-Rodriguez (2017).

Após, seguindo a técnica descrita por Andrade (2009) com modificações para a leitura no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, São José, CA, EUA), foram avaliados os espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras. Para isso, a concentração espermática foi ajustada para 5×10^6 espermatozoides/mL em meio TALP *sperm* sendo adicionado ao volume de 150 μ L do sêmen diluído, 2 μ L de SYTO-59 750mM, 1 μ L de IP 0,5 mg/mL e 1 μ L de FITC-PNA 37,5 μ g/mL. Após a adição das sondas fluorescentes, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 37° C e, ao final, as amostras foram diluídas a $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL com meio TALP *sperm*. A excitação foi feita com os lasers azul para a sonda FITC-PNA e vermelho para as sondas SYTO-59 e IP. A detecção foi feita pelos filtros FL1 para a sonda FITC-PNA, FL3 para a sonda IP e FL4 para a sonda SYTO-59. A população de interesse foi a que se apresentou negativa para a leitura de FITC-PNA e negativa para a leitura de IP sendo então a população de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras dada em porcentagem de células.

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado, sendo adicionado ao volume de 150 μ L do sêmen diluído a 5×10^6 espermatozoides/mL em meio TALP *sperm*, 2 μ L de SYTO-59 750mM, 1 μ L de IP 0,5 mg/mL e 1 μ L de JC-1 153 μ M. Após a adição das sondas fluorescentes, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 37° C e, ao final, as amostras foram diluídas a $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL com meio TALP *sperm*. A excitação foi feita com os lasers azul para a sonda JC-1 e vermelho para a sonda SYTO-59 e IP. A detecção foi feita nos filtros FL2 (para detectar os J agregados), FL1 (para detectar os monômeros) e FL4 para detectar SYTO-59. A detecção do IP foi feita no filtro FL3. A população de interesse foi a que se apresentou negativa para a leitura de IP e positiva para a leitura de J agregados sendo então a população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial dada em porcentagem de células.

Para a avaliação da produção de ânion superóxido mitocondrial, foi adicionado a 150 μ L do sêmen diluído a 5×10^6 espermatozoides/mL em meio TALP *sperm*, 1,5 μ L de MitoSOX 2 μ M sendo incubado por 30 minutos a 37° C. Aos 10 minutos de incubação, foi adicionado 1 μ L de YP 7,5 μ M e aos 20 minutos de incubação foi adicionado 1,5 μ L de SYTO-59 750 mM. Ao final da incubação, as amostras foram diluídas a $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL

com meio TALP *sperm* e a leitura foi realizada. Para a excitação das amostras foram utilizados os lasers azul para as sondas MitoSOX e YP e vermelho para a sonda SYTO-59. Para a detecção, foram utilizados os filtros FL2-A para a sonda MitoSOX, FL1-A para a sonda YP e FL4 para a sonda SYTO-59. A população de interesse foi a que se apresentou negativa para a leitura com YP e positiva para a leitura da sonda MitoSOX sendo então a população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e presença de ânion superóxido mitocondrial dada em porcentagem de células. A intensidade de fluorescência da sonda MitoSOX nos espermatozoides também foi considerada sendo que quanto maior a intensidade, maior a presença de ânion superóxido mitocondrial.

Para a avaliação da peroxidação lipídica, foi adicionado ao volume de 150 µL do sêmen diluído a 5×10^6 espermatozoides/mL em meio TALP *sperm*, 1 µL da sonda BODIPY 2 mM. Aos 20 minutos de incubação a 37° C, foi adicionado 1 µL de IP 0,5 mg/mL e 2 µL de SYTO-59 750 mM. Ao final dos 30 minutos totais de incubação a 37° C, as amostras foram diluídas a $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL com meio TALP e a leitura foi realizada. A excitação foi feita com os lasers azul para a sonda BODIPY e vermelho para a sonda SYTO-59 e IP. A detecção foi feita pelos filtros FL1-A para a sonda BODIPY, FL4 para SYTO-59 e FL3 para IP. Para esta análise, foi considerada a intensidade de fluorescência do BODIPY na população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, sendo que quanto maior a intensidade de fluorescência para a sonda BODIPY, maior a quantidade de peroxidação lipídica.

3.2.3.3. Seleção das partidas utilizadas para as avaliações moleculares e produção *in vitro* de embriões

As três partidas de cada touro foram avaliadas quanto aos aspectos convencionais e funcionais espermáticos descritos no tópico anterior. Com base nessas avaliações, foi selecionada uma partida de cada touro totalizando seis partidas para as próximas avaliações. A seleção das partidas foi feita com base em nota obtida pela partida por meio de fórmula, adaptada de Garcia (2004), considerando as características de motilidade progressiva (MPROG), avaliada pelo sistema CASA, defeitos maiores (MAI), defeitos menores (MEN) e células com integridade de membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA). A fórmula consistiu:

$\text{Nota da partida} = (1 * \text{MPROG}) + [(3 \times (100 - \text{MAI}))] + [(2 \times (100 - \text{MEN}))] + (3 \times \text{PIAIA})$

Com base na maior nota obtida, uma partida de cada touro foi escolhida para as próximas etapas do experimento.

3.2.3.4. Produção *in vitro* de embriões por fecundação *in vitro* e por ativação partenogenética

Para todas as etapas da produção *in vitro* de embriões (PIVE), as condições de cultivo foram as mesmas sendo 38,5° C com 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Além disso, em todas as etapas foram mantidas de 20 a 25 estruturas por microgota, sendo cada microgota de 90 µL.

Para a realização das PIVEs, foram utilizados oócitos provindos de ovários obtidos em abatedouros. Os ovários foram coletados e mantidos em garrafas térmicas a 35° C em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) aquecida durante o transporte e manipulação. No laboratório, foram aspirados somente folículos com diâmetro de 3 a 6 mm com agulha estéril de calibre 18G (BD Biosciences, São José, CA, EUA) acoplada a uma seringa estéril de 10 mL (BD Biosciences, São José, CA, EUA). O líquido folicular recuperado foi armazenado em tubos estéreis de 50 mL mantidos em repouso durante 15 minutos para a decantação. O sobrenadante foi então retirado e o precipitado foi colocado em placa de Petri de 100 mm com meio de lavagem TCM-199 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino livre de vesículas exossomais (SFBlivreEV; a depleção foi realizada por ultracentrifugação do soro fetal bovino a 120.000g por 16 horas), 22 µg/mL de piruvato de sódio e 50 µg/mL de gentamicina, e líquido folicular livre de sujidades, para seleção dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) sob microscópio estereoscópico (modelo SMZ 745T, Nikon, Tóquio, Japão). Somente foram selecionados COCs com citoplasma homogêneo e com camada espessa e compacta de células do *cumulus oophorus* de acordo com De Bem et al. (2014), sendo selecionados COCs grau I (mais de três camadas compactas de células do *cumulus*) e grau 2 (menos de 3 camadas compactas de células do *cumulus*).

Após a seleção, os COCs foram lavados em meio de lavagem e de maturação sendo colocados para maturar em microgotas de meio de maturação TCM-199 suplementado com 26 mM de bicarbonato de sódio, 10% de SFBlivreEV, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH; Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá) e 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor®, Ceva Saúde Animal, Londres, Inglaterra) cobertas por óleo mineral. Os oócitos permaneceram na etapa de maturação *in vitro* (MIV) durante 22 a 24 horas.

Após, finalizada a MIV, foram coletados em cada rotina de PIVE pelo menos um *pool* de cinco oócitos maduros por meio da avaliação da extrusão do primeiro corpúsculo polar. Os oócitos maduros foram submetidos ao procedimento de lise da zona pelúcida realizado com solução de 0,5% de Pronase (Protease de *Streptomyces griseus*) em PBS livre de sais (10 mg/mL de cloreto de sódio, 0,2 mg/mL de cloreto de potássio, 1,44 mg/mL de fosfato de sódio dibásico e 0,24 mg/mL de fosfato de potássio) com 0,1% de polivinilpirrolidona (PBS-PVP). Após a lise, os oócitos foram lavados em PBS-PVP antes de serem armazenados a -80° C. O restante dos presumíveis oócitos maduros foram utilizados para a etapa de fecundação *in vitro* (FIV) ou para a ativação partenogenética.

3.2.3.4.1. PIVE por fecundação *in vitro*

Para a etapa de fecundação *in vitro*, os presumíveis oócitos maduros foram lavados e colocados em microgotas de meio FIV contendo solução estoque de Tyrode's-lactato suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 40 µL/mL de PHE (2 mM de D-penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 245 µM de epinefrina), 5,5 UI/mL de heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) juntamente com espermatozoides. Os espermatozoides das diferentes partidas de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF) foram obtidos por meio de mini gradiente de separação de Percoll® (45% e 90%; Apêndice B) sendo a concentração final na gota de FIV ajustada para 1×10^6 espermatozoides/mL. Os oócitos e espermatozoides permaneceram nesta etapa durante 18 horas. Após, os presumíveis zigotos foram desnudados com auxílio de pipetador, lavados três vezes e colocados em microgotas de meio SOF (fluido sintético do oviduto) suplementado com aminoácidos, citrato e inositol e com 5 mg/mL de BSA, 2,5% de SFBlivreEV, 22 µg/mL de piruvato de sódio e 50 µg/mL de gentamicina coberto por óleo mineral. O cultivo foi feito em mono-camada de células do *cumulus* permanecendo nesta etapa durante os próximos seis dias de desenvolvimento. O *feeding* foi realizado retirando 50 µL do meio da gota de CIV e repondo com o mesmo volume de meio SOF quatro dias após a FIV.

Em cada rotina de PIVE foram realizadas duas etapas de FIVs diferentes, sendo uma com espermatozoides dos touros AF e outra com espermatozoides dos touros BF. No total, foram realizadas nove rotinas de FIV de modo que cada dupla de touros (AF e BF) foi utilizada em três diferentes rotinas de PIVEs. Em cada rotina, foram destinadas pelo menos duas gotas/touro para a avaliação e coleta de embriões com uma célula, duas gotas/touro para a avaliação e coleta de embriões com duas células e duas gotas/touro para a avaliação e coleta de

blastocistos. Em cada etapa, os embriões foram coletados em *pools* de cinco embriões sendo que os embriões de uma célula foram coletados de 16 a 18 horas após o início da FIV. Para isso, os embriões foram desnudados com auxílio de pipetador, já que a coleta foi antes do final da FIV, e foi avaliada a extrusão do segundo corpúsculo polar. De 28 a 30 horas após a FIV, coletaram-se embriões com duas células avaliados pela presença de dois blastômeros separados. Os blastocistos foram coletados no sétimo dia de desenvolvimento. Antes do armazenamento, os embriões de uma célula e duas células foram submetidos ao procedimento de lise da zona pelúcida realizado com solução de 0,5% de Pronase (Protease de *Streptomyces griseus*) em PBS-PVP. Após foram lavados três vezes em PBS-PVP antes de serem armazenados a -80° C. Os embriões no dia sete de desenvolvimento foram fixados. Para a fixação, os blastocistos foram mantidos durante 15 minutos em solução de PBS-PVP contendo 4% de formaldeído. Em seguida, os embriões foram lavados em PBS-PVP e mantidos nesta solução a 4° C até o processamento.

Além da coleta dos embriões no estágio de uma célula, duas células e blastocisto, as taxas de extrusão de segundo corpúsculo avaliada 16 a 18 horas após o início da FIV, a taxa de embriões com duas células avaliada 28 a 30 horas após o início da FIV, a taxa de clivagem avaliada no quarto dia de desenvolvimento e a taxa de blastocisto avaliada no sétimo dia de desenvolvimento foram calculadas com base no total de estruturas colocadas nas gotas destinadas a cada grupo de coleta.

3.2.3.4.2. PIVE por ativação partenogenética

Para a produção *in vitro* de embriões por ativação partenogenética foi seguido o protocolo descrito por De Bem et al. (2017). Para isso, ao final da etapa de MIV, os COCs foram completamente desnudados com 0,2% de hialuronidase em PBS com auxílio de pipetador. Após, foi avaliada a extrusão do primeiro corpúsculo polar e somente os oócitos maduros foram submetidos à ativação partenogenética. Os oócitos foram então incubados durante 5 minutos em meio H-119 (TCM-199 com 25 mM de Hepes suplementado com 0,5 mg/mL de BSA) com 5 µM de ionomicina por 5 minutos. Após, os oócitos foram lavados em H-199 saturado com 30 mg/mL de BSA e colocados em microgotas de cultivo contendo meio SOF suplementado com aminoácidos, citrato e inositol e com 5 mg/mL de BSA, 2,5% de SFBlivreEV, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de gentamicina e 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) coberto por óleo durante 3 horas. Ao final, os oócitos foram lavados e cultivados em meio SOF suplementado como descrito acima livre de 6-DMAP.

Assim como os embriões produzidos por FIV, os embriões partenogênicos foram coletados com uma célula e duas células em *pools* de cinco embriões de uma célula (14 a 16 horas após o início da ativação com 6-DMAP; sendo todos os embriões com uma célula coletados); e com duas células (20 a 22 horas após o início da ativação com 6-DMAP). Antes do armazenamento, os embriões de uma célula e duas células foram submetidos ao procedimento de lise da zona pelúcida realizado com solução de 0,5% de Pronase (Protease de *Streptomyces griseus*) em PBS-PVP. Após foram lavados em PBS-PVP antes de serem armazenados a -80° C.

Para os embriões partenogênicos, somente foram avaliadas as taxas de clivagem no quarto dia de desenvolvimento e de blastocisto no sétimo dia de desenvolvimento calculadas com base no total de oócitos maduros colocados nas gotas de desenvolvimento.

3.2.3.5. Avaliações moleculares

As avaliações moleculares consistiram primeiramente na investigação da abundância de 380 miRNAs totais (maduros e imaturos) diferentes (Apêndice C) nas seis partidas selecionadas dos touros AF e BF. Com base nos resultados desta primeira avaliação, foi montado um novo perfil de miRNAs (Apêndice D) que foi investigado:

- 1) Nas mesmas partidas de sêmen selecionadas dos touros Angus AF e BF, mas sob a forma de miRNAs maduros;
- 2) Nas demais partidas de sêmen dos touros Angus AF e BF avaliadas inicialmente quanto às características espermáticas morfofuncionais (investigados sob a forma de miRNAs totais);
- 3) Em partidas de sêmen comercial criopreservado de seis touros de alta (53,16±0,67% de taxa de prenhez; 19.388 serviços; 92 rebanhos) e baixa fertilidade (39,34±3,87% de taxa de prenhez; 5.117 serviços; 34 rebanhos) da raça Nelore (*Bos indicus*) também classificados pelo programa *ConceptPlus*® (investigados sob a forma de miRNAs totais);
- 4) Em embriões de uma célula e duas células produzidos por ativação partenogênica ou FIV com espermatozoides das partidas de sêmen selecionadas dos touros Angus (investigados sob as formas de miRNAs totais e também miRNAs maduros).

3.2.3.5.1. Avaliações da abundância dos miRNAs espermáticos

Para cada uma das avaliações espermáticas moleculares, com o objetivo de separar as células espermáticas do diluidor de sêmen e evitar a contaminação com células somáticas,

procedeu-se primeiramente com o mini gradiente de separação de Percoll® (45 e 90%; Apêndice B). Após a obtenção dos espermatozoides, adicionou-se 750 µL de TRIZOL® LS Reagent e 8 µL de *Polyacryl Carrier*® aos espermatozoides. Em seguida, a solução foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos e mantida em temperatura ambiente durante 5 minutos. Após, foi realizada a adição de 200 µL de clorofórmio sendo estas homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e mantidas por mais cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 15 minutos. Ao final da centrifugação, a fase aquosa obtida de cada amostra foi transferida para um microtubo limpo e adicionado a ele 1,5 vol de etanol absoluto. A solução foi transferida para a coluna do kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Ao final, o RNA total da amostra foi dissolvido em água ultrapura e mensurado no NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). A quantidade total de RNA e a relação 260/280 foram aferidas. Foram somente admitidas amostras com relação $\geq 1,80$.

Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA por meio do kit miScript RT Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante para a síntese de cDNA a partir do RNA total da amostra. Para a síntese de cDNA a partir de miRNAs maduros e imaturos (totais), adicionou-se aproximadamente 100 ng de RNA total a 2 µL de 5x HiFlex *buffer*, 2 µL de 10x mix de ácidos nucleicos e 1 µL da enzima transcriptase reversa. O kit também foi utilizado para a síntese de cDNA a partir dos miRNAs maduros da amostra, neste caso adicionou-se aproximadamente 100 ng de RNA total a 2 µL de 5x HiSpec *buffer*, 2 µL de 10x mix de ácidos nucleicos e 1 µL da enzima transcriptase reversa. A reação de volume final de 10 µL de cDNA foi colocada no termociclador e incubada a 37° C durante 1 hora e a 95° C durante 5 minutos para a inativação da enzima. Ao final, a amostra de cDNA foi mantida a 4° C sendo colocada em gelo.

As reações de PCR quantitativo foram então realizadas. Para isso, foi adicionado 1 µL de cada *primer* de miRNA a 10 µM (Apêndices C e D) com auxílio da pipeta multicanal em cada poço da placa de 384 poços. Foi utilizado o kit miScript SYBR Green PCR Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) para a síntese da solução Mix de SYBR com cDNA. Para isso, foi misturado 10 µL de cDNA, 578 µL de água ultrapura, 252 µL de primer universal e 1260 µL de SYBR Green® para a avaliação dos 380 miRNAs. Para a avaliação de placas com menos miRNAs, a reação empregada foi de 0,046 µL de cDNA, 1,37 µL de água ultrapura, 0,60 µL de primer universal e 3 µL de SYBR® Green para cada poço. A solução foi preparada e mantida protegida da luz. Em seguida, foi adicionado 5 µL da solução Mix a cada poço com auxílio de pipeta

automática. Por fim, a placa de 384 foi coberta e colocada no aparelho de PCR em tempo real QuantStudio™ 6 Flex (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA).

O protocolo de qPCR seguiu uma incubação inicial de 95° C durante 15 minutos (*Hold stage*), seguida por 45 ciclos de incubação primeiramente a 94° C por 15 segundos, após de 55° C por 30 segundos e por fim de 70° C por 30 segundos (*PCR stage*). Por fim, foi feita a curva de *melting*. Para confirmar a amplificação de produtos de cDNA, a curva de *melting* foi avaliada de cada miRNA. Além disso, os miRNAs só foram considerados como detectados quando a curva de amplificação destes teve início antes do ciclo 38. Os miRNAs endógenos utilizados foram bta-miR-99b e bta-miR-425-5p que foram escolhidos com base no programa NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004; MESTDAGH et al., 2009; FAGERLIND et al., 2015).

3.2.3.5.2. Avaliações da abundância dos miRNAs embrionários

Para as avaliações de miRNAs embrionários, *pools* de cinco embriões ou de cinco oócitos maduros foram submetidos primeiramente à extração de RNA. Ao *pool* foi adicionado 200 µL de TRIZOL® LS Reagent e 4 µL de *Polyacryl Carrier*®. Em seguida, a solução foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos e mantida em temperatura ambiente durante 5 minutos. Após, foi realizada a adição de 128 µL de clorofórmio sendo estas homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e mantidas por mais cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 15 minutos. Ao final da centrifugação, a fase aquosa obtida de cada amostra foi transferida para um microtubo limpo e adicionado a ele 1,5 vol de isopropanol. A solução foi transferida para a coluna do kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Ao final, o RNA total da amostra foi dissolvido em água ultrapura e mensurado no NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). A quantidade total de RNA e a relação 260/280 foram aferidas. Somente foram admitidas amostras com relação $\geq 1,80$.

Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA por meio do kit miScript RT Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante para a síntese de cDNA a partir do RNA total da amostra. Para a síntese de cDNA a partir de miRNAs maduros e imaturos (totais), adicionou-se aproximadamente 50 ng de RNA total a 2 µL de 5x HiFlex *buffer*, 2 µL de 10x mix de ácidos nucleicos e 1 µL da enzima transcriptase reversa. O kit também foi utilizado para a síntese de cDNA a partir dos miRNAs maduros da amostra, neste caso adicionou-se a aproximadamente 50 ng de RNA total a 2 µL de 5x HiSpec *buffer*, 2 µL de

10x mix de ácidos nucleicos e 1 µL da enzima transcriptase reversa. A reação de volume final de 10 µL de cDNA foi colocada no termociclador e incubada a 37° C durante 1 hora e a 95° C durante 5 minutos para a inativação da enzima. Ao final, a amostra de cDNA foi mantida a 4° C sendo colocada em gelo.

As reações de PCR quantitativo foram então realizadas. Para isso, foi adicionado 1 µL de cada *primer* de miRNA a 10 µM (Apêndice D). Foi utilizado o kit miScript SYBR Green PCR Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) para a síntese da solução Mix de SYBR com cDNA. Para isso, foi adicionado 0,046 µL de cDNA, 1,37 µL de água ultrapura, 0,60 µL de primer universal e 3 µL de SYBR Green® para cada poço. A solução foi preparada e mantida protegida da luz. Em seguida, foi adicionado 5 µL da solução Mix a cada poço com auxílio de pipeta automática. Por fim, a placa de 384 foi coberta e colocada no aparelho de PCR em tempo real QuantStudio™ 6 Flex (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA).

O protocolo de qPCR seguiu uma incubação inicial de 95° C durante 15 minutos (*Hold stage*), seguida por 45 ciclos de incubação primeiramente a 94° C por 15 segundos, após de 55° C por 30 segundos e por fim de 70° C por 30 segundos (*PCR stage*). Por fim, foi feita a curva de *melting*. Para confirmar a amplificação de produtos de cDNA, a curva de *melting* foi avaliada de cada miRNA. Além disso, os miRNAs só foram considerados como detectados quando a curva de amplificação destes teve início antes do ciclo 38. Os miRNAs endógenos utilizados foram bta-miR-99b e RNU43 snoRNA já utilizados em outros trabalhos do grupo (DEL COLLADO, 2017).

3.2.3.5.3. Avaliações da abundância dos mRNAs embrionários

Após os miRNAs serem avaliados, investigou-se os mRNAs alvo dos miRNAs que apresentaram diferentes níveis de abundância tanto nos espermatozoides quanto nos embriões. Para isso, primeiramente foi conferida a homologia dos miRNAs bovinos e dos miRNAs humanos pela plataforma de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Quando houve mais de 95% de homologia entre as sequências bovinas e humanas, foram então pesquisados os genes-alvo fortemente validados destes miRNAs pela plataforma miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.ntu.edu.tw/php/index.php>). Esses genes-alvo fortemente validados também foram pesquisados quanto à presença e importância no desenvolvimento embrionário inicial. Com base nesses critérios, foram então elencados três genes-alvo.

Os *primers* de mRNA dos genes-alvo elencados foram desenhados baseados na sequência fornecida pelo GenBank para a espécie bovina cujas informações da sequência e

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

tamanho do *amplicon* estão descritos no Quadro 3. Após o desenho dos *primers*, a especificidade dos mesmos foi verificada pela ferramenta Nucleotide Blast do site NCBI (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram selecionadas somente as sequências que apresentassem 100% de compatibilidade com o gene, sendo exclusivas para os genes em questão. Antes da utilização, os *primers* foram testados quanto à eficiência e tamanho em corrida em eletroforese em gel de agarose.

Quadro 3 – Genes-alvo, tamanho do produto, tipo de *primer* e sequência dos *primers* selecionados para avaliação da abundância nos embriões

Gene	Tamanho do produto	Primer	Sequência Pubmed (5'>3')
KRAS	133	Forward	GCCAGTTAGCTTGGTAGGTGT
		Reverse	AACCAAGGCATGGCAACAAT
BECN1	182	Forward	GCCTCTGAAACTGGACACGA
		Reverse	GGGGGATGAATCTGCGAGAG
JUN	140	Forward	TGCAAACGTTTTGAGGCGAG
		Reverse	GGGCTTTAGTCCTCGGACAC
β -ACTINA	158	Forward	TCGGTTGGATCGAGCATTC
		Reverse	CCTTAGAGAGAAGCGGGGTG

Fonte: Alves (2018).

Para a avaliação dos mRNAs embrionários, *pools* de cinco embriões foram submetidos à extração de RNA por meio do kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme descrito anteriormente. Em seguida, a síntese de cDNA foi feita por meio do kit High-Capacity® (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, EUA). Para isso, 20 μ L de cDNA foi sintetizado adicionando ao volume de RNA, 2 μ L de 10x RT *buffer*, 0,8 μ L de 25x dNTP mix, 2 μ L de 10x *Random Primers* e 1 μ L de Multi Scribe *reverse transcriptase*. A reação foi incubada no termociclador a 25° C durante 10 minutos, 37° C durante 2 horas e 85° C durante 5 minutos para a inativação da enzima. Ao final, a amostra de cDNA foi mantida a 4° C sendo colocada em gelo.

As reações de PCR quantitativo foram então realizadas. Para isso, foi adicionado o volume de 2 μ L de cDNA diluído a cada poço, totalizando 8,5 ng de RNA/reação, e 8 μ L de solução Mix que foi preparada adicionando 0,50 μ L de cada par de *primer* a 10 μ M, 5 μ L de Power Sybr® (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, EUA) e 2,5 μ L de água ultrapura. A reação de PCR foi feita no aparelho de PCR em tempo real QuantStudio™ 6 Flex (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA), sendo as condições utilizadas em cada reação de 95° C por 10 minutos (*Hold Stage*), seguidos por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 60 segundos (*PCR Stage*) e, por fim, a curva de *melting*. Os mRNAs só foram considerados como

detectados quando a curva de amplificação destes teve início antes do ciclo 34. O *primer* de β -actina foi utilizado como normalizador (Quadro 3).

3.2.1.6. Imunofluorescência para análise de proliferação celular em blastocistos

Para a técnica de imunofluorescência, foram utilizados oito blastocistos de AF e dez blastocistos de BF. Os blastocistos fixados e armazenados a 4° C em PBS-PVP foram permeabilizados durante 20 minutos em solução 1% Triton X-100. A seguir, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação não específicos com 5% de BSA e 22 mg/mL de glicina durante 1 hora em temperatura ambiente. Os embriões foram então incubados *overnight* a 4° C com o anticorpo primário anti-Ki-67 de coelho (1:100; 5500134; Sigma-Aldrich) diluído em solução de PBS com 1% de BSA. No outro dia, as amostras foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado com Alexa 488 (1:500; A11008; Thermo Fisher Scientific), diluído em solução de PBS com 1% de BSA durante 1 hora em temperatura ambiente. Ao fim da incubação, os blastocistos foram lavados 10 vezes em PBS-PVP para remover possíveis reações inespecíficas do anticorpo secundário e corados com 10 μ L/mL de HOE 33342 durante 15 minutos. Em seguida foram lavados em PBS-PVP e as lâminas foram montadas com Prolong Antifade (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA). As imagens dos blastocistos foram capturadas em microscópio confocal SP5 (Leica, Wetzlar, Alemanha) utilizando os lasers Argônio 488nm e o Diodo 405nm ajustados para cada fluoróforo em aquisição de sequências, utilizando aumento de 400x em óleo. O controle negativo foi feito para cada rotina de imunofluorescência realizada sendo omitido o anticorpo primário no protocolo. Para a leitura foi utilizada a máxima potência do laser. As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ® (NIH; <https://imagej.nih.gov/ij/>) no qual foi feita a aferição do diâmetro e a contagem do número total de células presentes no blastocisto, marcadas com Hoescht 33342, e a contagem do número de células em proliferação, marcadas em verde com Ki-67. A proporção de células não coradas e coradas em verde foi considerada para a estatística e cálculo da porcentagem de células em proliferação. O número total de células e o diâmetro de cada blastocisto também foi considerado para a estatística.

3.2.1.7. Avaliação do estágio de desenvolvimento dos blastocistos

No sétimo dia de desenvolvimento os blastocistos foram coletados e avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento. Para isso, os blastocistos foram classificados em: blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido conforme a presença de pouca ou muita de blastocele, tamanho do blastocisto e integridade da zona pelúcida.

3.2.1.8. Análise de enriquecimento funcional

Para a análise de enriquecimento funcional, os miRNAs que apresentaram abundância diferente entre os espermatozoides, zigotos e embriões de duas células produzidos a partir dos espermatozoides de touros AF e BF foram investigados quanto aos genes-alvos preditos pela plataforma TargetScanHuman (http://www.targetscan.org/vert_72/). Em seguida, foram identificados os 80 primeiros da lista de acordo com De Bem et al. (2017) e todos os genes em conjunto e de maneira simultânea foram analisados pela plataforma David – Functional Annotation Tool (David Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH; <https://david.ncifcrf.gov/>). Em seguida, as vias de sinalização foram ranqueadas de acordo com o escore de enriquecimento e número de genes envolvidos.

3.2.1.9. Análise estatística

Para a análise estatística, os dados foram previamente submetidos à avaliação das premissas estatísticas pelo teste de Shapiro-Wilk e, quando necessário, foram transformados ou retirados os *out-liers*. Quando não mencionado, o nível de significância considerado foi de 5%. Para a análise estatística das avaliações espermáticas convencionais e funcionais, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento *Mixed* do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 9.3) considerando os grupos de alta e baixa fertilidade. Para a análise estatística dos dados de fertilidade, produção de embriões e proliferação celular, o teste de Qui-Quadrado foi utilizado por meio do procedimento *Freq* do programa SAS. Para as análises moleculares, os dados de qPCR obtidos como ΔC_t foram normalizados pela média geométrica dos genes endógenos e submetidos à ANOVA, utilizando procedimento *Mixed* do programa SAS considerando os grupos AF, BF, embriões partenogenéticos e oócitos maduros, quando aplicado. Se adicionado o grupo de embriões partenogenéticos e de oócitos, foi utilizado o teste de médias de *Tukey*. O nível de significância

considerado para a avaliação dos 380 miRNAs espermáticos foi de 10%. Para as demais avaliações moleculares, o nível de significância foi de 5%. Para a apresentação dos dados sob a forma de abundância, os dados normalizados foram transformados em $2^{-\Delta Ct}$. Esses dados também foram usados para a análise e geração de imagens de *Heatmap* usando o programa Metaboanalyst 3.0 e para o diagrama de Venn.

3.2.2. Experimento 2

Para este experimento, primeiramente foi realizada a validação do modelo de indução de polispermia. Em seguida, o modelo foi empregado para a avaliação da abundância do miR-216b.

3.2.2.1. Validação do modelo de polispermia

Para a validação do modelo de indução de polispermia, ovários de abatedouro foram coletados e submetidos à produção *in vitro* de embriões sendo as coletas dos embriões realizadas 12 horas após o início da FIV para a avaliação da quantidade de pró-núcleos. A taxa de polispermia foi considerada sobre o total de embriões fecundados selecionados pela extrusão do segundo corpúsculo polar.

Na primeira etapa da validação, foram utilizadas quatro diferentes concentrações espermáticas na gota de FIV com o intuito de aumentar a taxa de embriões polispérmicos. Para isso, foi utilizada a concentração controle de 1×10^6 espermatozoides/mL e as concentrações a serem avaliadas quanto à indução de polispermia: 4×10^6 , 8×10^6 e 16×10^6 espermatozoides/mL. Para esta primeira parte da validação, utilizaram-se doses de sêmen criopreservado de uma mesma partida de um mesmo touro submetidas a duas rotinas de produção de embrião. Com base nas taxas de embriões polispérmicos obtidos, escolheu-se uma das concentrações espermáticas para ser validada para a indução da polispermia. Esta foi a concentração de 8×10^6 espermatozoides/mL.

Com base neste resultado, foi feita a segunda parte da validação. Para isso, sete rotinas de produção de embriões *in vitro* foram realizadas utilizando na etapa de FIV *pools* de espermatozoides provindos de doses de sêmen criopreservado de dois diferentes touros que foram submetidos à FIV utilizando a concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL como controle e a concentração de 8×10^6 espermatozoides/mL como indutora. Os embriões foram

coletados 12 horas após a FIV para a avaliação da quantidade de pró-núcleo. Somente foram coletados embriões com extrusão do segundo corpúsculo polar.

3.2.2.2. Avaliação da abundância de miR-216b nos embriões controle e induzidos

Para a avaliação da abundância de miR-216b nos embriões controle e induzidos à polispermia, foram realizadas cinco rotinas de PIVE com dois touros diferentes: uma partida de um touro AF e uma partida de um touro BF, de modo que, no experimento 1, o touro AF tivesse espermatozoides com a menor abundância do miR-216b e o touro BF tivesse espermatozoides com a maior abundância deste miRNA. Para cada partida, as concentrações espermáticas foram ajustadas na gota de FIV para que atendessem às concentrações validadas controle e induzida. Em cada rotina, *pools* de 15 embriões que apresentaram extrusão do segundo corpúsculo polar de cada um dos quatro grupos foram coletados 16 a 18 horas após a FIV e armazenados a -80° C. Após, foi realizada a avaliação dos níveis de abundância deste miRNA.

3.2.2.3. Produção *in vitro* de embriões (PIVE) e coletas dos embriões

Para a realização das PIVEs, foram utilizados oócitos provindos de ovários obtidos em abatedouros, seguido o mesmo protocolo de coleta e MIV descrito no experimento 1.

Após finalizada a etapa de MIV, os presumíveis oócitos maduros foram colocados em microgotas de meio FIV contendo solução estoque de Tyrode's-lactato, 50 µg/mL de gentamicina, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 40 µL/mL de PHE (2 mM de D-penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 245 µM de epinefrina), 5,5 UI/mL de heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) juntamente com os espermatozoides em diferentes concentrações espermáticas, conforme o grupo controle e induzido para a polispermia. Os espermatozoides foram obtidos por meio de mini gradiente de separação de Percoll® (45% e 90%; Apêndice B), sendo a concentração de espermatozoides final na gota de FIV ajustada conforme descrito anteriormente. Na validação, todos os embriões selecionados foram coletados e fixados para a avaliação da quantidade de pró-núcleos 12 horas após o início da FIV. Já para a avaliação da expressão relativa do miR-216b, *pools* de 15 embriões foram armazenados a -80° C e destinados à análise de qPCR de 16 a 18 horas após o início da FIV. Para ambas as finalidades, os embriões foram coletados, desnudados e tratados com solução de 0,5% de Pronase (Protease de *Streptomyces griseus*) em PBS-PVP para lise da zona pelúcida.

3.2.2.4. Avaliação da quantidade de pró-núcleo

Para a avaliação dos pró-núcleos, os embriões já sem a zona pelúcida foram fixados durante 15 minutos em solução de PBS-PVP contendo 4% de formaldeído. Ao final, foram lavados novamente em PBS-PVP e corados com 10 µL/mL de HOE 33342 durante 15 minutos. Em seguida foram lavados e utilizados para montar as lâminas com 10 µL de Prolong Antifade (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA). A análise da porcentagem de embriões polispérmicos foi feita avaliando a quantidade de embriões com dois pró-núcleos (não polispérmicos) e três ou mais pró-núcleos (polispérmicos). As imagens foram analisadas e capturadas em microscopia de epifluorescência (Nikon, modelo 80i, Tóquio, Japão) em aumento de 600x, utilizando-se o campo claro e o filtro UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm).

3.2.2.5. Avaliação da abundância do miR-216b

Para a avaliação da abundância do miR-216b, *pools* de 15 embriões foram submetidos à extração de RNA da mesma forma que descrito anteriormente no experimento 1. O protocolo de qPCR foi o mesmo que realizado no experimento 1 e os miRNAs endógenos utilizados foram também os miRNAs bta-miR-99b e RNU43 snoRNA.

3.2.2.6. Análise estatística

Para a análise estatística, os dados foram previamente submetidos à avaliação das premissas estatísticas pelo teste de Shapiro-Wilk e, quando necessário, foram transformados ou retirados os *out-liers*. O nível de significância considerado foi de 5%. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento *Mixed* do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 9.3) respeitando o delineamento em fatorial considerando os grupos de alta e baixa fertilidade e as diferentes concentrações espermáticas. Foi considerada a interação entre a fertilidade e concentração como efeito predominante. Quando não houve este efeito, foram considerados os efeitos isolados. Para a análise estatística das taxas de polispermia, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado por meio do procedimento *Freq* do programa SAS. Para as análises moleculares, os dados da qPCR obtidos como ΔC_t foram normalizados pela média geométrica dos genes endógenos. Para a apresentação dos dados sob a forma de abundância, os dados normalizados foram transformados em $2^{-\Delta C_t}$.

3.3. Resultados

3.3.1. Experimento 1

3.3.1.1. Caracterização da qualidade espermática dos touros

Inicialmente, com o objetivo de caracterizar a qualidade espermática dos touros, foram avaliadas três partidas de cada touro quanto às características espermáticas convencionais e funcionais. Além disso, por meio destas avaliações foram selecionadas as partidas a serem utilizadas nas etapas seguintes.

Em relação às características espermáticas convencionais (Tabela 1), as partidas dos touros BF foram semelhantes às partidas dos touros AF quanto às características de motilidade, vigor, concentração, defeitos menores, defeitos totais e total de espermatozoides na palheta. Já a porcentagem de defeitos espermáticos maiores foi maior nas palhetas dos touros BF e o número de células móveis na dose de sêmen foi menor neste grupo.

Tabela 1 - Média e erro padrão da média das características espermáticas convencionais considerando três partidas de cada touro dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Características espermáticas convencionais	Fertilidade		Valor de P
	AF ¹ (n=9)	BF ² (n=9)	
Motilidade subjetiva (%)	66,38±1,12	63,33±1,05	0,17
Vigor (1-5)	3,38±0,08	3,27±0,07	0,06
Concentração (x10 ⁶ espermatozoides/mL)	100,83±5,45	90,83±4,70	0,33
Defeitos maiores (%)	18,71±1,99	25,05±0,89	0,006
Defeitos menores (%)	4,65±1,09	4,18±0,68	0,72
Defeitos totais (%)	23,36±2,64	29,23±1,15	0,05
Total de espermatozoides por palheta (x10 ⁶)	25,21±1,36	22,71±1,17	0,17
Total de espermatozoides móveis por palheta (x10 ⁶)	17,10±0,83	13,54±0,84	0,002
Volume da dose na palheta (mL)	0,25	0,25	-

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade.

Em seguida, foram realizadas as avaliações espermáticas de motilidade computadorizada e avaliação da integridade e funcionalidade de componentes celulares pela microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (Tabela 2). No que se refere às características de motilidade avaliada pelo sistema CASA, a velocidade curvilinear (VCL), a velocidade de trajeto (VAP) e o deslocamento lateral da cabeça (ALH) foram mais elevados nos touros BF, sendo as características de linearidade (LIN) e índice de oscilação (WOB) mais

baixos neste grupo de touros. No tocante às avaliações por microscopia de fluorescência da integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial e quantidade de espécies reativas ao oxigênio, os touros BF apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com alta quantidade de espécies reativas ao oxigênio. Já as avaliações por citometria de fluxo em relação à integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial, quantidade de espécies reativas ao oxigênio mitocondriais e peroxidação lipídica não mostraram diferenças entre as partidas de touros AF e BF.

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

Tabela 2 – Média e erro padrão da média das características funcionais da motilidade avaliadas pelo sistema CASA e da integridade de membranas, função mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica avaliadas pela microscopia de fluorescência e citometria de fluxo considerando três partidas de cada touro dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Características espermáticas funcionais	Fertilidade		Valor de P
	AF ¹ (n=9)	BF ² (n=9)	
<i>Características da motilidade</i>			
Motilidade total (%)	76,66±1,91	71,93±1,70	0,07
Motilidade progressiva (%)	54,66±1,99	52,48±1,71	0,41
Células rápidas (%)	70,49±1,75	66,69±1,56	0,11
Velocidade curvilinear (VCL; µm/s)	145,79±2,59	172,79±3,69	<0,0001
Velocidade progressiva (VSL; µm/s)	78,35±2,66	83,91±1,94	0,10
Velocidade de trajeto (VAP; µm/s)	97,45±1,53	105,39±1,58	0,001
Linearidade (LIN; %)	53,71±1,60	48,71±1,02	0,01
Retilinearidade (STR; %)	81,11±1,44	80,61±0,93	0,77
Índice de oscilação (WOB; %)	66,02±0,98	60,37±0,79	<0,0001
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm)	2,66±0,04	3,41±0,12	<0,0001
Frequência de batimento (BCF; Hz)	22,29±0,33	23,11±0,53	0,20
<i>Integridade de membranas, função mitocondrial e produção de ROS por microscopia de fluorescência</i>			
PIAIA ³ (%)	42,72±2,40	42,08±1,84	0,82
Integridade de membrana plasmática (PI; %)	44,41±2,40	46,77±2,62	0,51
Integridade de membrana acrossomal (AI; %)	53,41±2,39	57,66±1,42	0,13
Alto potencial de membrana mitocondrial (AP; %)	58,00±3,23	52,61±2,78	0,21
Red ⁴ (%)	6,11±1,31	10,63±1,49	0,03
<i>Integridade de membranas, função mitocondrial, produção de ROS e peroxidação por citometria de fluxo</i>			
Integridade de membrana plasmática (%)	48,99±1,86	44,64±4,32	0,36
Integridade de membrana acrossomal (%)	80,74±2,53	74,31±2,38	0,08
Integridade de membranas plasmática e acrossomal (%)	48,85±1,87	44,31±4,34	0,35
Integridade de membrana plasmática e alto potencial de membrana mitocondrial (%)	23,94±2,35	23,84±1,68	0,97
Integridade de membrana plasmática e presença de espécies reativas ao oxigênio mitocondriais (%)	5,60±0,86	4,10±0,65	0,18
Intensidade de fluorescência das espécies reativas ao oxigênio mitocondriais espermáticas (ua)	632,03±31,18	599,05±64,88	0,66
Intensidade de fluorescência da peroxidação lipídica espermática (ua)	2.119,94±245,92	2.735,44±400,20	0,20

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade; ³PIAIA: espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ⁴Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red®.

3.3.1.2. Seleção das partidas utilizadas para as avaliações moleculares e produção *in vitro* de embriões

Após as avaliações de todas as partidas dos touros, foi selecionada uma partida de cada touro para serem submetidas às avaliações moleculares e à produção *in vitro* de embriões. A seleção foi feita pela fórmula descrita anteriormente: $Nota = (1,5 * MPROG) + [(3 \times (100 - MAI))] + [(2 \times (100 - MEN))] + (3 \times PIAIA)$, de modo que quanto maior a nota obtida, melhor a qualidade da partida. As notas obtidas por cada partida estão apresentadas na tabela 3. As partidas que estão destacadas em negrito na tabela foram as que obtiveram melhores notas e assim foram selecionados para dar prosseguimento com o experimento, sendo a partida 1 do touro AF-1, 3 do touro AF-2, 1 do touro AF-3, 1 do touro BF-1, 3 do touro BF-2 e 3 do touro BF-3. Os resultados individuais das partidas de cada touro estão relacionados no Apêndice E.

Tabela 3 – Seleção das partidas segundo as notas obtidas por cada partida de cada touro considerando a fórmula: $Nota = (1,5 * MPROG) + [(3 \times (100 - MAI))] + [(2 \times (100 - MEN))] + (3 \times PIAIA)$. As partidas selecionadas estão destacadas em negrito

Touro	Partida	MPROG ³ (%)	MAI ⁴ (%)	MEN ⁵ (%)	PIAIA ⁶ (%)	Nota
AF ¹ -1	1	54,15	20,75	9,25	58,25	675,23
	2	52,85	13,17	2,36	34,25	637,80
	3	43,25	22,00	7,25	37,25	596,13
AF ¹ -2	1	55,00	7,75	1,50	45,75	693,50
	2	59,30	16,25	1,75	49,00	683,70
	3	68,20	8,75	3,00	43,25	699,80
AF ¹ -3	1	49,20	20,00	7,25	45,25	635,05
	2	60,05	33,00	4,75	41,75	606,83
	3	50,00	26,75	4,75	29,75	574,50
BF ² -1	1	49,75	23,25	3,75	37,75	610,63
	2	48,40	19,75	4,00	33,75	606,60
	3	46,05	23,25	3,00	35,75	600,58
BF ² -2	1	49,40	27,75	3,50	39,25	601,60
	2	57,50	26,75	6,00	38,50	609,50
	3	63,15	27,25	6,00	40,50	622,48
BF ² -3	1	51,10	30,75	4,00	46,75	616,65
	2	44,55	24,25	4,25	49,25	633,33
	3	62,50	22,45	3,19	57,25	691,77

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade; 1; ³MPROG: média da porcentagem de células com motilidade progressiva avaliada pelo sistema CASA; ⁴MAI: média da porcentagem de espermatozoides com defeitos espermáticos maiores; ⁵MEN: média da porcentagem de espermatozoides com defeitos espermáticos menores; ⁶PIAIA: espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial.

3.3.1.3. Avaliação das características espermáticas convencionais e funcionais das partidas selecionadas

Nesta segunda parte, descrevemos os resultados das avaliações espermáticas convencionais e funcionais das seis partidas selecionadas previamente. Em relação às avaliações espermáticas convencionais de motilidade, vigor, concentração e porcentagem de defeitos, as seis partidas não diferiram entre os touros AF e BF conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Média e erro padrão da média das características espermáticas convencionais considerando três partidas de sêmen de três touros de alta fertilidade (AF) e três partidas de sêmen de três touros de baixa fertilidade (BF)

Características espermáticas convencionais	Fertilidade		Valor de P
	AF ¹ (n=3)	BF ³ (n=3)	
Motilidade subjetiva (%)	68,33±0,83	60,83±3,63	0,11
Vigor (1-5)	3,50±0,14	3,33±0,16	0,49
Concentração (x10 ⁶ espermatozoides/mL)	90,00±11,27	88,33±11,55	0,92
Defeitos maiores (%)	16,50±3,88	24,31±1,48	0,13
Defeitos menores (%)	6,50±1,84	4,31±0,85	0,34
Defeitos totais (%)	23,00±5,68	28,63±2,34	0,41
Total de espermatozoides por palheta (x10 ⁶)	22,50±2,81	22,08±2,88	0,92
Total de espermatozoides móveis por palheta (x10 ⁶)	15,34±1,90	13,52±2,44	0,58

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade.

Considerando as avaliações espermáticas funcionais (Tabela 5), os grupos de touros AF e BF foram semelhantes quanto às características da motilidade avaliadas pelo sistema CASA e também semelhantes quanto às características de integridade das membranas plasmática e acrossomal, funcionalidade de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica avaliadas pela microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

Tabela 5 – Média e erro padrão da média das características funcionais da motilidade avaliadas pelo sistema CASA e da integridade das membranas, função mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica considerando três partidas de sêmen de três touros de alta fertilidade (AF) e três partidas de sêmen de três touros de baixa fertilidade (BF)

Características espermáticas funcionais	Fertilidade		Valor de P
	AF ¹ (n=3)	BF ² (n=3)	
<i>Características da motilidade</i>			
Motilidade total (%)	82,21±1,38	73,95±5,29	0,20
Motilidade progressiva (%)	57,18±5,69	58,46±4,36	0,86
Células rápidas (%)	75,56±0,24	69,28±4,64	0,24
Velocidade curvilínea (VCL; µm/s)	144,70±8,00	172,01±10,75	0,11
Velocidade progressiva (VSL; µm/s)	75,66±6,74	87,36±3,45	0,19
Velocidade de trajeto (VAP; µm/s)	95,00±4,27	104,75±5,62	0,23
Linearidade (LIN; %)	52,48±4,93	51,00±2,15	0,79
Retilinearidade (STR; %)	79,35±4,22	83,55±1,31	0,39
Índice de oscilação (WOB; %)	65,90±2,73	61,06±2,14	0,23
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm)	2,63±0,11	3,31±0,28	0,09
Frequência de batimento (BCF; Hz)	21,80±0,72	24,18±1,12	0,14
<i>Integridade de membranas, função mitocondrial e produção de ROS por microscopia de fluorescência</i>			
PIAIA ³ (%)	48,91±4,70	45,16±6,09	0,65
Integridade de membrana plasmática (PI; %)	51,50±5,10	48,50±6,39	0,69
Integridade de membrana acrossomal (AI; %)	60,75±3,55	59,41±4,14	0,81
Alto potencial de membrana mitocondrial (AP; %)	62,58±7,88	54,75±7,18	0,50
Red+ ⁴ (%)	5,16±0,88	10,66±4,96	0,33
<i>Integridade de membranas, função mitocondrial, produção de ROS e peroxidação por citometria de fluxo</i>			
Integridade de membrana plasmática (%)	49,47±0,33	45,63±8,21	0,66
Integridade de membrana acrossomal (%)	83,89±2,28	78,31±3,66	0,26
Integridade de membranas plasmática e acrossomal (%)	49,29±0,28	45,38±8,26	0,66
Integridade de membrana plasmática e alto potencial de membrana mitocondrial (%)	24,44±2,08	26,32±2,86	0,62
Integridade de membrana plasmática e presença de espécies reativas ao oxigênio mitocondriais (%)	5,29±1,59	4,14±1,00	0,57
Intensidade de fluorescência das espécies reativas ao oxigênio mitocondriais espermáticas (ua)	621,00±76,21	678,33±23,53	0,51
Intensidade de fluorescência da peroxidação lipídica espermática (ua)	2.502,00±395,58	2.764,83±921,79	0,80

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade; ³PIAIA: espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ⁴Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red®.

3.3.1.4. Produção *in vitro* de embriões

As partidas selecionadas dos touros AF e BF foram utilizadas para a produção *in vitro* de embriões juntamente com a produção de embriões partenogênicos como grupo controle. Conforme mostrado na tabela 6, a taxa de clivagem avaliada no quarto dia de desenvolvimento foi semelhante nos três grupos. Da mesma forma, a taxa de blastocisto foi semelhante entre os grupos de embriões produzidos com sêmen dos touros AF e touros BF. No entanto, o grupo de embriões partenogênicos apresentou taxa de blastocisto maior que os grupos AF e BF (Tabela 6).

Tabela 6 – Dados de desenvolvimento pré-implantacional dos blastocistos produzidos por PIVE utilizando espermatozoides de touros de alta e de baixa fertilidade e PIVE de embriões partenogênicos

Grupos	Nº. oócitos ¹	Embriões clivados em D4 ²	Clivagem (%)	Blastocistos em D7 ³	Blastocisto (%)
Alta Fertilidade	335	251	74,93±3,55	111	33,13±2,94 ^b
Baixa Fertilidade	375	290	77,33±2,88	115	30,66±4,10 ^b
Partenogênicos	300	228	76,00±2,98	126	42,00±2,88 ^a

Fonte: Alves (2018).

Nota: Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Legenda: ¹Número de oócitos utilizados por grupo para a produção de blastocistos; ²Número de embriões clivados avaliados no quarto dia de desenvolvimento; ³Número de blastocistos no sétimo dia de desenvolvimento; Clivagem e blastocisto: média e erro padrão média das taxas de clivagem avaliada no quarto dia de desenvolvimento e taxa de blastocisto avaliada no sétimo dia de desenvolvimento.

Da mesma forma, a avaliação da taxa de extrusão do segundo corpúsculo polar, desconsiderando o grupo partenogênico, não apresentou diferença entre os embriões produzidos com espermatozoides dos touros AF e BF, sendo semelhante entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7 – Dados de desenvolvimento pré-implantacional dos zigotos produzidos por PIVE utilizando espermatozoides de touros de alta e de baixa fertilidade

Grupos	Nº oócitos ¹	Estruturas fecundadas ²	Taxa de extrusão do 2º CP (%) ³
Alta Fertilidade	329	160	48,63±2,06
Baixa Fertilidade	322	139	43,16±4,23

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹Número de oócitos utilizados por grupo para a produção de zigotos; ²Número de estruturas fecundadas avaliadas pela extrusão do 2º corpúsculo polar (CP) 16 a 18h após a fecundação *in vitro*; ³Média e erro padrão média da taxa de estruturas apresentando extrusão do 2º corpúsculo polar (CP).

Já no tocante à avaliação da taxa de primeira clivagem, ou seja, a avaliação dos embriões que apresentaram duas células 28 a 30 horas após a fecundação *in vitro*, os embriões

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

produzidos com espermatozoides AF e os embriões partenogenéticos apresentaram maior taxa da primeira clivagem do que os embriões produzidos com espermatozoides de touros BF conforme mostrado na tabela 8.

Tabela 8 – Dados de desenvolvimento pré-implantacional dos embriões de duas células produzidos por PIVE utilizando espermatozoides de touros de alta e de baixa fertilidade e PIVE partenogenética

Grupos	Nº oócitos ¹	Embriões clivados ²	Taxa da primeira clivagem (%) ³
Alta Fertilidade	273	75	27,47±3,80 ^a
Baixa Fertilidade	278	52	18,70±3,73 ^b
Partenogenéticos	227	70	30,83±3,73 ^a

Fonte: Alves (2018).

Notas: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Legenda: ¹Número de oócitos utilizados por grupo para a produção de embriões de duas células; ²Número de embriões que apresentaram a primeira clivagem, ou seja, duas células de 28 a 30h após a fecundação *in vitro*; ³Média e erro padrão média da taxa de primeira clivagem.

3.3.1.5. Avaliações moleculares

3.3.1.5.1. Avaliações espermáticas moleculares

As seis partidas foram avaliadas quanto ao perfil de 380 miRNAs espermáticos. Destes 380 miRNAs pesquisados, 298 foram detectados nos espermatozoides dos touros AF e BF. Dos miRNAs detectados, 24 miRNAs foram exclusivamente detectados nos touros AF e 32 miRNAs foram exclusivamente detectados nos touros BF. Os restantes 242 miRNAs foram comumente detectados nos dois grupos conforme ilustrado no diagrama de Venn (Figura 2).

Figura 2 – Diagrama de Venn dos miRNAs detectados nos espermatozoides dos touros dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Fonte: Alves (2018).

Dos 242 miRNAs detectados em ambos os grupos (Apêndice F), nove miRNAs apresentaram-se diferencialmente abundantes nos grupos AF e BF considerando $P < 0,10$ (Figura 3). Destes nove miRNAs, três apresentaram diferença com valor de P menor que 0,05: bta-miR-205, -505 e -532. Os outros seis (bta-miR-33b, -126-5p, -216b, -339a, -500 e -542-5p) apresentaram valor de P entre 0,05 e 0,1. Os miRNAs bta-miR-205, -505, -532, -33b, -126-5p, -500 and -542-5p apresentaram maior abundância nos espermatozoides dos touros AF, enquanto somente os miRNAs bta-miR-216b e -miR-339a apresentaram maior abundância nos espermatozoides dos touros BF.

Figura 3 – Análise de Heatmap e dendrograma não supervisionados dos nove miRNAs diferencialmente abundantes, considerando $P < 0,10$, nos espermatozoides dos touros dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Fonte: Alves (2018).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade

Além da avaliação dos miRNAs detectados em ambos os grupos, foram avaliados os miRNAs exclusivamente detectados em cada grupo. Para isso, foi feito o ranqueamento dos miRNAs exclusivamente detectados de modo a serem selecionadas os cinco miRNAs mais abundantes e exclusivos dos espermatozoides de AF e também dos espermatozoides de BF (Tabela 9).

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

Tabela 9 – Médias e erro padrão da média da abundância ($2^{-\Delta Ct}$) e número de amostras em que os miRNAs foram detectados (entre parênteses) em ordem decrescente de abundância dos miRNAs exclusivamente detectados nos espermatozoides dos touros de alta fertilidade (AF) e de baixa fertilidade (BF). Os cinco mais expressos de cada grupo (destacados em negrito) foram selecionados para as análises subsequentes

miRNAs exclusivos - Alta Fertilidade			miRNAs exclusivos - Baixa Fertilidade		
Posição	miRNA	Nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$)	Posição	miRNA	Nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$)
1	bta-miR-1225-3p	0,3219±0,09 (3)	1	bta-miR-195	0,7968±0,53 (2)
2	bta-miR-425-3p	0,0826±0,02 (3)	2	bta-let-7b	0,0878±0,07 (3)
3	bta-miR-874	0,0226±0,007 (2)	3	bta-miR-148a	0,0271±0,01 (3)
4	bta-miR-146a	0,0142±0,007 (3)	4	bta-miR-146b	0,0066±0,002 (3)
5	bta-miR-147	0,0028±0,0006 (3)	5	bta-miR-137	0,0027±0,001 (2)
6	bta-miR-219	0,0027±0,0006 (3)	6	bta-miR-543	0,0021±0,00004 (3)
7	bta-miR-502b	0,0023±0,00003 (2)	7	bta-miR-181c	0,0017±0,0004 (2)
8	bta-miR-495	0,0022±0,0006 (2)	8	bta-miR-302a	0,0017±0,001 (2)
9	bta-miR-31	0,0022±0,0001 (2)	9	bta-miR-17-3p	0,0016±0,0006 (3)
10	bta-miR-212	0,0017±0,00001 (2)	10	bta-miR-362-3p	0,0013±0,0008 (2)
11	bta-miR-380-3p	0,0013±0,00004 (2)	11	bta-miR-378c	0,0013±0,0005 (3)
12	bta-miR-154c	0,0012±0,0002 (3)	12	bta-miR-670	0,0012±0,0004 (2)
13	bta-miR-545-3p	0,0012±0,0003 (2)	13	bta-miR-455-5p	0,0011±0,0009 (2)
14	bta-miR-149-5p	0,0011±0,0004 (3)	14	bta-miR-483	0,0010±0,0005 (2)
15	bta-miR-27a-5p	0,0010±0,0003 (3)	15	bta-miR-424-5p	0,0010±0,0008 (2)
16	bta-miR-331-3p	0,0009±0,0001 (2)	16	bta-miR-377	0,0010±0,0003 (3)
17	bta-miR-142-5p	0,0009±0,0006 (2)	17	bta-miR-488	0,0008±0,0002 (2)
18	bta-miR-145	0,0008±0,00003 (2)	18	bta-miR-379	0,0007±0,0002 (2)
19	bta-miR-302b	0,0007±0,0002 (2)	19	bta-miR-499	0,0007±0,0003 (2)
20	bta-miR-32	0,0006±0,0003 (2)	20	bta-miR-424-3p	0,0007±0,0002 (2)
21	bta-miR-133b	0,0004±0,0002 (2)	21	bta-miR-107	0,0006±0,00008 (2)
22	bta-miR-655	0,0004±0,0001 (2)	22	bta-miR-129-3p	0,0005±0,0001 (3)
23	bta-miR-411b	0,0003±0,0001 (3)	23	bta-miR-371	0,0005±0,0003 (2)
24	bta-miR-301b	0,0002±0,0001 (2)	24	bta-miR-502a	0,0005±0,0001 (2)
			25	bta-miR-671	0,0005±0,000003 (2)
			26	bta-miR-503-5p	0,0004±0,0001 (2)
			27	bta-miR-301a	0,0003±0,0001 (2)
			28	bta-miR-362-5p	0,0003±0,0002 (2)
			29	bta-miR-376a	0,0003±0,00005 (2)
			30	bta-miR-361	0,0002±0,00001 (3)
			31	bta-miR-448	0,0001±0,00001 (2)
			32	bta-miR-21-3p	0,0001±0,0001 (2)

Fonte: Alves (2018).

Com os resultados de diferença entre os grupos e exclusividade, gerou-se um novo perfil de 19 miRNAs alvo (Apêndice D) cuja análise de enriquecimento funcional mostrou envolvimento de algumas vias como Wnt, de sinalização do cálcio e da PI3K-AKT (Figura 4).

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

Este novo perfil foi então avaliado: 1) nas partidas selecionadas, porém nesta nova etapa de avaliação, os miRNAs foram investigados sob a forma de miRNAs maduros. Até o momento, os resultados obtidos e apresentados mostraram os miRNAs em sua forma madura e imatura, ou seja, os miRNAs totais presentes na célula espermática; 2) nas demais partidas dos touros Angus utilizados no experimento cujas análises convencionais e funcionais foram descritas anteriormente (investigados sob a forma de miRNAs totais); 3) em partidas de seis touros de alta e baixa fertilidade da raça Nelore também classificados pelo programa *ConceptPlus*[®] (investigados sob a forma de miRNAs totais); e, por fim, 4) em embriões de uma célula e duas células produzidos com os espermatozoides das partidas de sêmen selecionadas (investigados sob as formas de miRNAs totais e também miRNAs maduros).

Figura 4 – Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs diferentemente abundantes nos espermatozoides de alta e baixa fertilidade em **A**, top cinco exclusivamente detectados nos espermatozoides de alta fertilidade em **B** e top cinco exclusivamente detectados nos espermatozoides de baixa fertilidade em **C**

Fonte: Alves (2018).

Quanto às avaliações da forma madura dos 19 miRNAs avaliados anteriormente sob a forma total, somente sete miRNAs foram detectados em ambos os grupos (Figura 5). Desses miRNAs, somente o miR-195 apresentou valor de P entre $0,05 < P < 0,10$ ($P=0,09$). Dos miRNAs analisados, o miR-216b foi exclusivamente detectado no grupo de touros BF não sendo detectado sob a forma madura no grupo de touros AF. Oito miRNAs não foram detectados nos grupos. Sendo assim, pode-se notar que os miRNAs avaliados estão em sua maioria sob a forma imatura.

Figura 5 – Análise de Heatmap e dendrograma supervisionados da abundância dos sete miRNAs maduros detectados nos espermatozoides dos touros dos grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Fonte: Alves (2018).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

Quando avaliados os 19 miRNAs na forma total nas demais partidas dos touros Angus, cujas avaliações morfofuncionais estão descritas nesta tese, somente dois miRNAs, miR-205 e -532, dos 19 miRNAs avaliados foram diferentemente abundantes considerando $P < 0,05$ (Figura 6). A análise de enriquecimento funcional dos genes-alvos destes miRNAs também mostrou, dentre outras, envolvimento com a via de sinalização Wnt (Figura 7).

Figura 6 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) dos dois miRNAs diferentemente expressos nas 18 partidas de sêmen dos touros Angus de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Fonte: Alves (2018).

Nota: *Indica diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

Figura 7 – Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs miR-205 e miR-532

Fonte: Alves (2018).

Da mesma forma, a avaliação dos 19 miRNAs sob a forma total nas partidas de sêmen criopreservado dos touros da raça Nelore de alta e baixa fertilidade, mostrou que somente um miRNA, o miR-339a, apresentou abundância distinta entre os espermatozoides dos touros de alta e baixa fertilidade assim como apresentou na avaliação inicial dos 380 miRNAs nos espermatozoides dos touros Angus (Figura 8).

Figura 8 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-339a em partidas de touros da raça Nelore (*Bos indicus*) de alta (AF) e baixa fertilidade (BF) e em partidas de touros da raça Aberdeen Angus (*Bos taurus*) de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Fonte: Alves (2018).

Nota: *Indica diferença entre os grupos com $P \leq 0,05$. #Indica diferença entre os grupos considerando $0,05 \leq P \leq 0,10$.

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

3.3.1.5.2. Avaliações embrionárias moleculares

a. Avaliações dos miRNAs embrionários

O perfil de 19 miRNAs tanto totais quanto somente maduros foi também avaliado nos embriões de uma célula, duas células produzidos por ativação partenogenética e por fecundação

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

in vitro com as partidas de sêmen dos touros AF e BF. Além do grupo de embriões partenogenéticos, foi introduzido um novo grupo controle para estas avaliações, os oócitos maduros.

Em relação aos miRNAs totais avaliados nos embriões de uma célula, somente os miR-216b e miR-445-3p apresentaram níveis de abundância distintos ($P < 0,05$) entre os quatro grupos (Figura 9; Tabela 10). O miR-216b apresentou maior abundância nos zigotos produzidos com espermatozoides dos touros BF do que nos embriões produzidos com espermatozoides dos touros AF. Os embriões partenogenéticos e os oócitos maduros apresentaram níveis de abundância intermediários e não diferenciaram dos zigotos AF e BF. Já o miR-425-3p apresentou maior nível de abundância nos oócitos maduros sendo a abundância deste miRNA mais baixa e similar nos embriões AF, BF e PA (Figura 9).

Figura 9 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-216b e miR-425-3p totais (maduro + imaturo) avaliados em zigotos produzidos por fecundação *in vitro* com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros

Fonte: Alves (2018).

Notas: Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade; PA: embriões partenogenéticos; OO: oócitos maduros.

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

Tabela 10 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs totais (maduro + imaturo) avaliados em zigotos produzidos por fecundação *in vitro* com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros

Zigoto	AF ¹ (n=9)	BF ² (n=9)	PA ³ (n=9)	OO ⁴ (n=3)	Valor de P
bta-miR-let7b	0,001±0,0003 (7)	0,004±0,003 (8)	0,001±0,0005 (8)	0,002±0,0008 (3)	0,51
bta-miR-33b	0,001±0,0001 (9)	0,002±0,0009 (9)	0,001±0,0002 (9)	0,001±0,0004 (3)	0,54
bta-miR-126-5p	0,0008±0,0001 (8)	0,002±0,001 (8)	0,001±0,0006 (6)	0,0004±0,0001 (3)	0,13
bta-miR-137	nd	nd	nd	nd	nd
bta-miR-146a	0,003±0,001 (3)	0,003±0,0007 (4)	0,002±0,0002 (4)	0,001±0,0008 (2)	0,17
bta-miR-146b	0,003±0,001 (6)	0,001±0,0006 (6)	0,003±0,0009 (6)	0,0008±0,0002 (3)	0,13
bta-miR-147	0,003±0,0006 (8)	0,007±0,004 (6)	0,002±0,0004 (9)	0,001±0,0004 (3)	0,73
bta-miR-148a	0,09±0,01 (9)	0,16±0,09 (9)	0,06±0,01 (9)	0,12±0,04 (3)	0,53
bta-miR-195	0,034±0,007 (9)	0,07±0,03 (9)	0,02±0,003 (9)	0,04±0,009 (3)	0,35
bta-miR-205	0,027±0,007 (9)	0,06±0,03 (9)	0,02±0,003 (9)	0,02±0,01 (3)	0,78
bta-miR-216b	0,0006±0,0001 ^b (7)	0,002±0,00003 ^a (6)	0,001±0,0003 ^{ab} (5)	0,0006±0,0003 ^{ab} (3)	0,03
bta-miR-339a	0,020±0,002 (9)	0,01±0,002 (8)	0,01±0,003 (9)	0,01±0,003 (3)	0,09
bta-miR-425-3p	0,25±0,01 ^b (9)	0,36±0,16 ^b (9)	0,19±0,01 ^b (9)	0,73±0,21 ^a (3)	<0,0001
bta-miR-500	0,001±0,0004 (8)	0,005±0,005 (5)	0,0007±0,0001 (8)	0,001±0,0005 (3)	0,33
bta-miR-505	0,013±0,002 (9)	0,02±0,01 (9)	0,01±0,001 (9)	0,01±0,003 (3)	0,28
bta-miR-532	0,001±0,0004 (8)	0,006±0,005 (5)	0,002±0,0006 (7)	0,0009±0,0002 (3)	0,92
bta-miR-542-5p	0,0009±0,0003 (4)	0,006±0,006 (2)	0,0005±0,0002 (2)	0,0006±0,0003 (2)	0,60
bta-miR-874	0,01±0,001 (9)	0,02±0,01 (9)	0,01±0,003 (9)	0,01±0,006 (3)	0,13
bta-miR-1225-3p	0,38±0,03 (9)	0,57±0,27 (9)	0,36±0,04 (9)	0,29±0,02 (3)	0,41

Fonte: Alves (2018).

Notas: Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade; ³PA: embriões partenogenéticos; ⁴OO: oócitos maduros.

Já a avaliação dos miRNAs totais nos embriões de duas células mostrou que os miRNAs miR-126-5p, -339a, -425-3p, -532, -874 e -1225-3p apresentaram menores níveis de abundância nos oócitos maduros do que nos embriões de duas células partenogenéticos e de embriões de AF e BF, sem distinção entre os grupos de AF, BF e de embriões partenogenéticos. As vias de sinalização dos genes-alvo destes miRNAs mostram envolvimento com processos quimiotáticos, de amplificação de sinal (via da MAPK) e degradação de RNA (Figura 10). O miR-216b, que apresentou diferentes níveis de abundância entre os zigotos AF e BF, não apresentou diferença entre os embriões de duas células desses grupos conforme exposto na Tabela 11.

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

Tabela 11 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs totais (maduro + imaturo) avaliados em embriões de duas células produzidos por fecundação *in vitro* com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros

Embrião 2 células	AF ¹ (n=9)	BF ² (n=9)	PA ³ (n=9)	OO ⁴ (n=3)	Valor de P
bta-miR-let7b	0,002±0,0006 (9)	0,004±0,001 (8)	0,003±0,001 (9)	0,002±0,0008 (3)	0,36
bta-miR-33b	0,001±0,0003 (9)	0,002±0,005 (9)	0,001±0,0004 (9)	0,001±0,0004 (3)	0,87
bta-miR-126-5p	0,05±0,02 ^a (9)	0,07±0,04 ^a (9)	0,02±0,01 ^a (8)	0,004±0,0001 ^b (3)	0,02
bta-miR-137	0,0001±. (1)	0,001±0,0004 (3)	0,003±0,002 (3)	. (0)	0,30
bta-miR-146a	0,003±0,001 (6)	0,003±0,001 (7)	0,002±0,0007 (6)	0,001±0,0008 (2)	0,87
bta-miR-146b	0,005±06 (8)	0,005±0,002 (9)	0,003±0,001 (9)	0,0008±0,0002 (3)	0,37
bta-miR-147	0,001±0,0002 (8)	0,002±0,0003 (7)	0,001±0,0005 (9)	0,001±0,0004 (3)	0,19
bta-miR-148a	0,12±0,009 (9)	0,12±0,01 (9)	0,14±0,01 (9)	0,17±0,01 (2)	0,26
bta-miR-195	0,04±0,005 (9)	0,04±0,005 (9)	0,05±0,01 (9)	0,04±0,009 (3)	0,95
bta-miR-205	0,04±0,01 (9)	0,05±0,01 (9)	0,05±0,01 (9)	0,02±0,01 (3)	0,52
bta-miR-216b	0,002±0,0005 (8)	0,001±0,0002 (7)	0,001±0,0005 (8)	0,0006±0,0003 (3)	0,43
bta-miR-339a	0,12±0,02 ^a (9)	0,12±0,03 ^a (9)	0,08±0,01 ^a (9)	0,01±0,003 ^b (3)	0,0002
bta-miR-425-3p	71,99±17,65 ^a (9)	80,50±11,83 ^a (8)	49,29±15,18 ^a (9)	0,73±0,21 ^b (3)	<0,0001
bta-miR-500	0,13±0,06 (9)	0,10±0,05 (9)	0,15±0,08 (9)	0,001±0,0005 (3)	0,20
bta-miR-505	0,05±0,01 (9)	0,06±0,02 (9)	0,05±0,01 (9)	0,01±0,003 (3)	0,10
bta-miR-532	0,02±0,01 ^a (9)	0,02±0,01 ^a (9)	0,01±0,007 ^a (9)	0,0009±0,0002 ^b (3)	0,02
bta-miR-542-5p	0,002±0,0005 (9)	0,003±0,0006 (9)	0,001±0,0005 (9)	0,0006±0,0003 (2)	0,11
bta-miR-874	0,08±0,0009 ^a (9)	0,07±0,006 ^a (9)	0,08±0,01 ^a (9)	0,01±0,006 ^b (3)	<0,0001
bta-miR-1225-3p	29,14±4,04 ^a (9)	30,51±4,64 ^a (8)	25,03±6,21 ^a (9)	0,29±0,02 ^b (3)	<0,0001

Fonte: Alves (2018).

Notas: Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade; ³PA: embriões partenogenéticos; ⁴OO: oócitos maduros.

Figura 10 – Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs miR-126-5p, -339a, -425-3p, -532, -874 e -1225-3p que apresentaram maior abundância nos embriões de duas células do que nos oócitos maduros

Fonte: Alves (2018).

Todos os resultados apresentados até o momento foram baseados nas avaliações dos miRNAs totais (maduro + imaturo) presentes nos embriões. Em relação às avaliações somente dos miRNAs maduros, não houve diferença entre a abundância dos miRNAs nos diferentes

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

grupos quando comparado os zigotos (Tabela 12). O miR-216b que, quando avaliado em sua forma total, foi detectado como diferente entre os grupos de zigotos e oócitos, na avaliação somente da forma madura, não foi detectado na maioria das amostras, sendo detectado somente em um *pool* de embriões AF, 2 *pools* de embriões BF, 3 *pools* de embriões partenogénéticos e em um *pool* de oócitos maduros (Tabela 12).

Tabela 12 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs maduros avaliados em zigotos produzidos por fecundação *in vitro* com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogénética e em oócitos maduros

Zigotos - maduros	¹ AF (n=9)	² BF (n=9)	³ PA (n=9)	⁴ OO (n=3)	Valor de P
bta-miR-let7b	0,002±0,0003 (6)	0,002±0,0005 (7)	0,004±0,001 (4)	0,003±0,001 (3)	0,43
bta-miR-33b	0,004±0,0008 (9)	0,003±0,0007 (7)	0,005±0,001 (9)	0,002±0,0002 (3)	0,32
bta-miR-126-5p	0,002±0,0002 (9)	0,003±0,0007 (8)	0,002±0,0009 (9)	0,002±0,001 (2)	0,26
bta-miR-137	0,002±. (1)	. (0)	. (0)	. (0)	.
bta-miR-146a	0,002±0,0007 (5)	0,002±0,0007 (3)	0,001±0,0003 (4)	0,003±0,001 (3)	0,23
bta-miR-146b	0,0015±0,0004 (6)	0,002±0,0003 (4)	0,003±0,001 (4)	0,002±0,0001 (2)	0,27
bta-miR-147	0,0003±. (1)	0,0005±. (1)	0,0004±0,0002 (2)	. (0)	0,93
bta-miR-148a	0,13±0,01 (9)	0,14±0,02 (8)	0,17±0,03 (9)	0,22±0,01 (3)	0,38
bta-miR-195	0,03±0,005 (9)	0,02±0,004 (9)	0,02±0,007 (9)	0,05±0,01 (3)	0,20
bta-miR-205	0,01±0,003 (9)	0,02±0,005 (7)	0,02±0,005 (7)	0,02±0,005 (3)	0,23
bta-miR-216b	0,0004±. (1)	0,001±0,00009 (2)	0,002±0,001 (3)	0,001±. (1)	.
bta-miR-339a	0,002±0,0006 (8)	0,003±0,0008 (4)	0,005±0,001 (6)	0,005±0,004 (3)	0,39
bta-miR-425-3p	0,08±0,01 (9)	0,12±0,02 (9)	0,07±0,01 (9)	0,10±0,02 (3)	0,34
bta-miR-500	0,002±0,001 (6)	0,001±0,001 (3)	0,001±0,0004 (5)	0,001±. (1)	0,60
bta-miR-505	0,002±0,001 (6)	0,003±0,001 (6)	0,001±0,0004 (8)	0,005±0,003 (3)	0,47
bta-miR-532	0,006±0,002 (5)	0,005±0,003 (5)	0,004±0,002 (2)	. (0)	0,79
bta-miR-542-5p	.	0,0004±. (1)	0,003±. (1)	0,0005±. (1)	.
bta-miR-874	0,005±0,0004 (9)	0,009±0,002 (8)	0,005±0,001 (9)	0,01±0,001 (3)	0,12
bta-miR-1225-3p	0,03±0,006 (9)	0,04±0,01 (9)	0,05±0,01 (9)	0,08±0,02 (3)	0,36

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade; ³PA: embriões partenogénéticos; ⁴OO: oócitos maduros.

Por fim, os miRNAs maduros nos embriões de duas células diferentemente dos miRNAs totais nesta mesma categoria de embriões, apresentaram em sua maioria, menores níveis de abundância nos grupos de embriões AF, BF e partenogénéticos do que nos oócitos maduros. Além disso, diferentemente do perfil de miRNAs maduros verificado nos embriões de uma célula, os embriões de duas células, em sua maioria, apresentaram abundância distinta dos oócitos (Tabela 13).

O miR-216b na forma madura foi detectado somente em um *pool* de embriões de duas células AF e em um *pool* de oócitos maduros assim como tinha ocorrido com os zigotos. Já nos embriões BF, este miRNA deixou de ser detectado nos embriões de duas células, enquanto nos

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

zigotos foi detectado em dois *pools*. Da mesma forma, nos embriões partenogenéticos esse miRNA que foi detectado em 3 *pools* de embriões de uma célula, quando avaliado nos embriões de duas células só foi detectado em um *pool* (Tabela 13).

Tabela 13 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta C_t}$) e número de amostras em que o miRNA foi detectado (entre parênteses) dos miRNAs maduros avaliados em embriões de duas células produzidos por fecundação *in vitro* com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade, por ativação partenogenética e em oócitos maduros

Duas células - maduros	AF ¹ (n=9)	BF ² (n=9)	PA ³ (n=9)	OO ⁴ (n=3)	Valor de P
bta-miR-let7b	0,0003±0,0001 ^b (5)	0,0002±0,00006 ^b (5)	0,0001±0,00006 ^b (3)	0,003±0,001 ^a (3)	0,02
bta-miR-33b	0,0002±0,00003 ^b (9)	0,0002±0,00002 ^b (9)	0,0002±0,00002 ^b (9)	0,002±0,0002 ^a (3)	<0,0001
bta-miR-126-5p	0,0002±0,00002 ^b (9)	0,0002±0,00002 ^b (9)	0,0002±0,00001 ^b (9)	0,002±0,001 ^a (2)	<0,0001
bta-miR-137	. (0)	. (0)	. (0)	. (0)	.
bta-miR-146a	0,0002±0,00002 (2)	0,0001±. (1)	0,0001±. (1)	0,003±0,001 (3)	.
bta-miR-146b	0,0002±. (1)	0,00008±0,00001 (2)	. (0)	0,002±0,0001 (2)	.
bta-miR-147	. (0)	. (0)	. (0)	. (0)	.
bta-miR-148a	0,003±0,003 ^b (6)	0,001±0,001 ^b (5)	0,001±0,0006 ^b (5)	0,22±0,04 ^a (3)	0,0003
bta-miR-195	0,0006±0,0003 ^b (8)	0,0002±0,00006 ^b (9)	0,0003±0,00008 ^b (9)	0,05±0,01 ^a (3)	<0,0001
bta-miR-205	0,0006±. (1)	0,0004±. (1)	0,0001±. (1)	0,02±0,005 (3)	.
bta-miR-216b	0,0001±. (1)	. (0)	0,00007±. (1)	0,001±. (1)	.
bta-miR-339a	0,0002±0,0001 ^b (6)	0,0001±0,00006 ^b (3)	0,0001±0,00008 ^b (3)	0,005±0,004 ^a (3)	0,04
bta-miR-425-3p	0,001±0,0007 ^b (9)	0,0008±0,0002 ^b (9)	0,0006±0,0001 ^b (9)	0,10±0,02 ^a (3)	<0,0001
bta-miR-500	0,0008±0,0007 (3)	0,0006±0,0005 (2)	0,0002±0,0001 (4)	0,001±. (1)	0,87
bta-miR-505	0,0001±0,00007 ^b (3)	0,0003±0,0001 ^{ab} (2)	0,0002±0,00008 (3) ^{ab}	0,005±0,003 ^a (3)	0,02
bta-miR-532	0,0004±0,0002 (3)	0,0002±. (1)	0,0002±0,0001 (6)	. (0)	0,48
bta-miR-542-5p	. (0)	. (0)	. (0)	0,0005±. (1)	.
bta-miR-874	0,0002±0,0001 ^b (9)	0,0001 ^b ±0,00009 (9)	0,0001 ^b ±0,00004 (9)	0,01±0,001 ^a (3)	0,04
bta-miR-1225-3p	0,0007±0,0004 ^b (8)	0,0005±0,0002 ^b (7)	0,0003±0,00008 (8) ^b	0,08±0,02 ^a (3)	<0,0001

Fonte: Alves (2018).

Notas: Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Legenda: ¹AF: alta fertilidade; ²BF: baixa fertilidade; ³PA: embriões partenogenéticos; ⁴OO: oócitos maduros.

Diante dos resultados anteriores, somente o miR-216b em sua forma total (madura + imatura) apresentou abundância distinta entre os zigotos produzidos com espermatozoides de AF e BF assim como apresentou abundância distinta nos espermatozoides de AF e BF. Entretanto, alterações nos níveis de abundância desse miRNA não foram detectadas nos embriões de duas células (Figura 11). Além disso, a forma madura deste miRNA foi detectada em sete amostras de zigotos independente do grupo (Tabela 12), já nos embriões de duas células, esta forma foi detectada em três amostras independente do grupo (Tabela 13) sugerindo uma diminuição na abundância da forma madura. Assim, esperamos que este miRNA possa causar efeitos logo no início do desenvolvimento embrionário. Dessa forma, decidimos

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

investigar a expressão dos genes-alvo deste miRNA nos embriões de uma célula e também de duas células produzidos com espermatozoides dos touros AF e BF.

Figura 11 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) e do miR-216b total (maduro+imaturo) nos espermatozoides dos touros AF e BF e nos embriões de uma e de duas células produzidos por fecundação *in vitro* com os espermatozoides de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF), embriões partenogenéticos e oócitos maduros

Fonte: Alves (2018).

Notas: #Indica diferença entre os grupos com $P \leq 0,10$ ($P=0,08$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$) ($P=0,03$).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade; PA: embriões partenogenéticos; OO: oócitos maduros.

b. Avaliações de genes-alvo embrionários do miR-216b

Para encontrar os genes-alvo do miR-216b, primeiramente foi determinada a homologia deste miRNA em humanos e verificou-se que o bta-miR-216b apresenta 100% de homologia ao hsa-miR-216b-5p (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise de homologia do miR-216b de bovinos em humanos

miRNA bovino	Sequência bta	miRNA humano	Sequência hsa	Homologia
bta-miR-216b	aaaucucugcaggcaaauguga	hsa-miR-216b-5p	aaaucucugcaggcaaauguga	100%

Fonte: miRBase (2018).

Em seguida, determinou-se os genes-alvo fortemente validados deste miRNA por meio do banco de dados miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) e se os mesmos já foram descritos em embriões (Quadro 4). Assim, verificou-se que o hsa-miR-216b-5p apresenta três genes-alvo fortemente validados que já foram descritos em embriões. Os genes-alvo *KRAS* e *BECN1* foram descritos em embriões bovinos de 8 células (GRAF et al., 2014b) e o gene-alvo *JUN* em embriões murinos (YU et al., 2018). Com essa seleção, em seguida foi pesquisado se estes genes-alvo já foram descritos como importantes no desenvolvimento embrionário de outras espécies sendo os três descritos como importantes para o desenvolvimento embrionário de camundongos (Quadro 4). Também foi considerada a preservação do sítio de ligação do miRNA no gene-alvo e assim foi verificada se a região 3' UTR dos genes-alvo apresentava homologia entre humanos e bovinos, notando-se que os genes-

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

alvo escolhidos apresentavam a região 100% preservada entre as espécies. Assim, concluiu-se que esses genes seriam potenciais genes-alvo do miR-216b que poderiam ter efeito sobre o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos.

Quadro 4 – Genes-alvo do miR-216b fortemente validados

miRNA	Genes-alvo ¹	Nome do gene	Presença embrião bovino ²	Importância desenvolvimento embrionário
hsa-miR-216b-5p	<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogene	8 células	Camundongos (JOHNSON et al., 1997; KOERA et al., 1997)
	<i>BECN1</i>	Beclin 1	8 células	Camundongos (YUE et al., 2003)
	<i>JUN</i>	JUN proto-oncogene	Não descrita	Camundongos (JOHNSON et al., 1993; YU et al., 2018)

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹Genes-alvo fortemente validados com base em informações da plataforma miRTarBase (2018); ²GRAF et al., 2014

Os níveis de abundância dos genes *KRAS*, *BECN1* e *JUN* nos zigotos foi semelhante entre os grupos AF e BF (Figura 12). Entretanto, nos embriões de duas células, o gene *KRAS* apresentou maior abundância nos embriões de duas células produzidos com espermatozoides dos touros AF do que nos embriões produzidos com espermatozoides dos touros BF. Já os genes *BECN1* e *JUN* não apresentaram diferença de abundância entre os grupos de embriões AF e BF conforme exposto na Figura 13.

Figura 12 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) dos genes *KRAS*, *BECN1* e *JUN* nos zigotos produzidos por fecundação *in vitro* com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade

Fonte: Alves (2018).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

Figura 13 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) dos genes *KRAS*, *BECN1* e *JUN* nos embriões de duas células produzidos por fecundação *in vitro* com espermatozoides de touros de alta fertilidade e baixa fertilidade

Fonte: Alves (2018).

Nota: *Indica diferença entre os grupos com $P \leq 0,05$ ($P=0,02$).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

Ainda, a diferença dos níveis de abundância do gene *KRAS* no estágio de duas células parece ser decorrente mais pelo aumento da abundância de *KRAS* nos embriões de duas células AF do que pela diminuição da abundância do mesmo nos embriões de duas células BF (Figura 14). Da mesma forma, o nível de abundância do miR-216b nas amostras de embriões AF parece aumentar mais ao longo do tempo do que a abundância do mesmo diminuiu no grupo de embriões de BF (Figura 14).

Figura 14 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) dos genes *KRAS* e do miR-216b total nos embriões de uma e duas células produzidos por fecundação *in vitro* com os espermatozoides de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF)

Fonte: Alves (2018).

Nota: *Indica diferença entre os grupos com $P \leq 0,05$.

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

Assim, o gene *KRAS* por meio de regulação feita pelo miR-216b pode estar envolvido com o sucesso da prenhez do grupo AF. O gene *KRAS* é um proto oncogene relacionado com o processo de proliferação celular; quando este gene está presente, ocorre proliferação e diferenciação celular, já quando este gene está ausente não ocorre proliferação, diferenciação nem desenvolvimento embrionário (JOHNSON et al., 1997; KOERA et al., 1997; NAKAMURA et al., 2008). Assim, na próxima etapa os experimentos propostos investigaram

se há diferença nas taxas de proliferação celular, número de células e estágio de desenvolvimento dos blastocistos produzidos por fecundação *in vitro* com sêmen dos touros AF e BF. Além disso, outro ponto importante que foi investigado no estudo é se de fato o miR-216b é entregue pelo espermatozoide ao embrião no experimento 2.

3.3.1.6. Avaliação da proliferação celular e do estágio de desenvolvimento dos blastocistos

Devido à diferença nos níveis de abundância do gene *KRAS* nos embriões de duas células, a proliferação celular nos blastocistos foi investigada nos diferentes grupos de fertilidade. Para isso, a porcentagem de proliferação celular foi calculada com base na proporção de células positivas para a proteína KI-67 marcadas em verde nos blastocistos (Figura 15). Apesar da abundância de *KRAS* estar diferente nos embriões com duas células, a média de proliferação celular e o diâmetro dos blastocistos não diferiu entre os grupos AF e BF, sendo respectivamente a taxa de proliferação e o diâmetro de $3,93 \pm 0,70\%$ e $235,37 \pm 18,34 \mu\text{m}$ nos blastocistos AF e $3,95 \pm 0,65\%$ e $218,40 \pm 16,66 \mu\text{m}$ de nos blastocistos BF, conforme mostra a figura 16. Entretanto, a contagem do número de células dos blastocistos mostrou que houve maior número de células nos blastocistos AF ($182,37 \pm 22,30$) do que nos blastocistos BF ($119,30 \pm 15,52$) conforme mostra a figura 16.

Figura 15 – Imagens de microscopia confocal de blastocistos marcados com a proteína KI-67. Em **A**, imagem de blastocisto produzido com espermatozoides de alta fertilidade marcado com a proteína KI-67. Em **B**, imagem de blastocisto controle negativo para a proteína KI-67

Fonte: Alves (2018).

Figura 16 – Média e erro padrão da média da porcentagem de proliferação celular, do diâmetro e do número absoluto de células dos blastocistos de touros de alta e baixa fertilidade avaliados no sétimo dia de desenvolvimento

Fonte: Alves (2018).

Nota: *Indica diferença entre os grupos com $P \leq 0,05$ ($P=0,02$).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

Por fim, quanto ao estágio de desenvolvimento dos blastocistos, os grupos de blastocistos AF e BF apresentaram semelhança nas taxas de blastocistos inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido conforme mostra a tabela 15.

Tabela 15 – Média e erro padrão da média do estágio dos blastocistos avaliados no sétimo dia de desenvolvimento embrionário

Grupos	No. de blastocistos	Blastocistos iniciais (%)	Blastocistos (%)	Blastocistos expandidos (%)	Blastocistos eclodidos (%)
AF ¹	120	3,33±1,98 (4/120)	28,33±5,14 (34/120)	51,66±5,90 (62/120)	16,66±5,73 (20/120)
BF ²	103	6,80±3,49 (7/103)	25,24±5,69 (26/103)	43,68±3,95 (45/103)	24,27±5,08 (25/103)

Fonte: Alves (2018).

Legenda: AF¹: alta fertilidade; BF²: baixa fertilidade; entre parênteses, os números absolutos de blastocistos para cada estágio sobre o total de blastocistos avaliados do grupo.

3.3.2. Experimento 2

Primeiramente, foi realizada a validação do modelo de indução de polispermia. Para isso, as concentrações espermáticas de 1, 4, 8 e 16×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV foram avaliadas em teste inicial. Embora não diferenciando dos demais tratamentos empregados na taxa de polispermia, a concentração de 8×10^6 espermatozoides/mL foi a que apresentou maiores taxas de polispermia e não apresentou variações ao longo dos testes iniciais conforme ilustrado na figura 17.

Figura 17 – Média e erro padrão da média das taxas de polispermia dos tratamentos Conc-1, Conc-4, Conc-8 e Conc-16

Fonte: Alves (2018).

Legenda: Conc-1: concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; Conc-4: concentração de 4×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; Conc-8: concentração de 8×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; e Conc-16: concentração de 16×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV.

Assim, baseado nesses resultados e na literatura com camundongos e touros (FUKUDA; CHANG, 1978; CAMARGO et al., 2002), decidiu-se avaliar as taxas de polispermia de embriões inseminados com a concentração espermática que normalmente se utiliza na produção *in vitro* de embriões de 1×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV (grupo Conc-1); e de embriões produzidos utilizando oito vezes mais espermatozoides na gota de FIV (concentração espermática de 8×10^6 espermatozoides/mL; Conc-8) para finalizar a validação.

Os resultados mostraram então que a taxa de polispermia do grupo induzido Conc-8 foi maior ($29,78 \pm 5,93\%$) que a taxa do grupo controle Conc-1 ($7,88 \pm 4,74\%$) conforme mostra a tabela 16. Assim, o aumento da taxa de polispermia no grupo Conc-8 foi de 3,77 vezes. Dentre os embriões polispérmicos, $17,55 \pm 4,65\%$ apresentaram três pró-núcleos (Figura 18) e $12,23 \pm 3,12\%$ apresentaram quatro ou mais que quatro pró-núcleos (Figura 18) conforme exposto na tabela 16. Conc-8 apresentou 2,9 vezes mais embriões com três pró-núcleos e 6,72 vezes mais embriões com quatro ou mais de quatro pró-núcleos do que Conc-1. Dessa forma, confirmou-se o aumento da taxa de polispermia pelo modelo proposto.

3. Capítulo 2: “Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”

Tabela 16 - Dados de produção de zigotos polispérmicos para a validação do modelo de indução de polispermia

Grupos	Nº oócitos	2 PN	≥3 PN	Pol. Total (%) ³	=3 PN	Pol. =3PN (%) ⁴	≥4 PN	Pol. ≥4 PN (%) ⁵
Conc-1 ¹	165	152	13	7,88±4,74^b	10	6,06±4,70 ^b	3	1,82±0,43 ^b
Conc-8 ²	188	132	56	29,78±5,93^a	33	17,55±4,65 ^a	23	12,23±3,12 ^a

Fonte: Alves (2018).

Notas: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,001$).

Legenda: PN: pró-núcleo; ¹Conc-1: concentração espermática de 1×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; ²Conc-8: concentração espermática de 8×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; média e erro padrão da média da porcentagem de embriões com três ou mais de três pró-núcleos (³Polispermia total), com exatamente três pró-núcleos (⁴Polispermia = 3PN) e com quatro ou mais de quatro pró-núcleos (⁵Pol. ≥4PN)

Figura 18 - Imagens de microscopia de epifluorescência em aumento de 600x de embriões bovinos não polispérmicos apresentando dois pró-núcleos em **A** e **B**, embriões bovinos polispérmicos apresentando três pró-núcleos em **C** e quatro ou mais pró-núcleos em **D**, **E** e **F**

Fonte: Alves (2018).

Em seguida, o modelo foi utilizado para avaliar se o espermatozoide é capaz de entregar o miR-216b ao embrião. Para isso, foram realizadas FIVs utilizando espermatozoides de um touro de alta e de um touro de baixa fertilidade. Os resultados da avaliação dos níveis de abundância deste miRNA nos zigotos produzidos com espermatozoides de touros AF mostraram que houve aumento de 4,5 vezes da abundância do miR-216b nos zigotos produzidos com oito vezes mais espermatozoides (Conc-8) em relação aos zigotos produzidos com Conc-1 (Figura 19). Já nos zigotos produzidos com espermatozoides de touros BF, apesar de a abundância deste miRNA ter aumentado 1,5 vez nos zigotos produzidos com oito vezes mais espermatozoides (Conc-8), esta não apresentou diferença em relação à abundância verificada

nos zigotos produzidos em Conc-1 (Figura 19). Ainda, confirmando os achados do experimento 1, a abundância do miR-216b foi maior nos zigotos produzidos com espermatozoides BF do que AF.

Figura 19 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-216b total nos zigotos produzidos por fecundação *in vitro* com os espermatozoides de touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF) em diferentes concentrações na gota de FIV (Conc-1 x Conc-8)

Fonte: Alves (2018).

Notas: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença na concentração ($P \leq 0,05$). * Indica diferença entre os grupos.

Legenda: Conc-1: concentração espermática de 1×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; Conc-8: concentração espermática de 8×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade.

A interação fertilidade*concentração foi significativa ($P=0,02$) e observou-se aumento nos níveis de abundância dos zigotos de Conc-8 conforme visto na figura 19. Apesar disso, somente o grupo AF apresentou diferença da Conc-1 para Conc-8. Assim, para mostrar melhor o efeito da polispermia, decidimos considerar somente o efeito de concentração para avaliar se de fato a indução da polispermia levou ao aumento da abundância do miR-216b. Conforme mostra a figura 20, a abundância do miR-216b isolando-se o efeito da concentração espermática, isto é, independente dos grupos de espermatozoides de touros AF e BF, mostra que os níveis de abundância do miR-216b foi 2,5 vezes maior nos zigotos produzidos com oito vezes (Conc-8) mais espermatozoides na gota de FIV do que os zigotos produzidos com a concentração espermática controle Conc-1 (Figura 20).

Figura 20 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-216b total nos zigotos produzidos por fecundação *in vitro* em diferentes concentrações na gota de FIV (Conc-1 x Conc-8)

Fonte: Alves (2018).

Nota: *Indica diferença entre os grupos com $P \leq 0,05$ ($P = 0,002$).

Legenda: Conc-1: concentração espermática de 1×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV; Conc-8: concentração espermática de 8×10^6 espermatozoides/mL na gota de FIV.

3.4. Discussão

Este estudo teve o objetivo de descrever o papel dos miRNAs espermáticos no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. Para isso, buscou-se primeiramente encontrar miRNAs que apresentassem níveis de abundância diferentes entre amostras espermáticas de touros de alta e baixa fertilidade. Os touros de alta e baixa fertilidade foram selecionados com base no programa *Concept Plus*® de avaliação de fertilidade da empresa Alta Genetics®, que possui alto poder estatístico em identificar diferenças de fertilidade de touros independente do efeito da partida de sêmen. Neste programa, a empresa envia amostras de sêmen criopreservado dos touros de interesse para diferentes técnicos que as utilizam para a inseminação de diferentes categorias de fêmeas, em diferentes rebanhos e regiões do Brasil e de alguns países da América do Sul. Os dados são compilados e avaliados inicialmente por uma equipe técnica treinada com o objetivo de selecionar somente os dados confiáveis antes de serem submetidos à avaliação estatística. Em seguida, os dados selecionados são submetidos a testes estatísticos de alto poder e são identificados os touros de alta e baixa fertilidade. Após, a validação do modelo é feita utilizando amostras espermáticas dos touros de forma prospectiva e apresenta alta confirmação dos resultados iniciais. Os touros de alta fertilidade utilizados no estudo, quando submetidos à avaliação prospectiva da fertilidade, apresentaram taxas de prenhez de 49,2% e os touros de baixa fertilidade apresentaram taxas de prenhez de 35,9%, confirmando as taxas retrospectivas de fertilidade identificadas (ZANATTA et al., 2017).

No presente estudo, as amostras espermáticas desses touros foram avaliadas em duas etapas. Na primeira etapa, com o objetivo de identificar possíveis causas que justificassem a diferença entre as taxas de fertilidade dos touros, três partidas de cada touro foram analisadas

no tocante às características espermáticas convencionais e funcionais. Nestas avaliações, embora a porcentagem de espermatozoides anormais tenha sido maior nas amostras dos touros de baixa fertilidade, ambas ultrapassaram o valor preconizado pelo Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) que recomenda que se tenha até 10% de defeitos maiores. Entretanto, no Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) anterior, aceita-se que partidas que tenham mais de 10×10^6 espermatozoides/mL possam ter até 20% de defeitos maiores, o que ocorreu somente com as partidas dos touros AF. Porém, segundo Seidel (2012), o valor limite de defeitos que não afeta a fertilidade é de 30%; a partir dessa porcentagem, parece haver prejuízo à fertilidade. Tanto as amostras dos touros AF quanto BF não apresentaram mais que 30% de anormalidades. Além disso, sabemos que existem diversas técnicas para avaliar esta característica e algumas, como a microscopia de contraste de interferência diferencial utilizada neste estudo, possui maior poder em detectar algumas anormalidades que outras técnicas, tais como a microscopia de contraste de fase não têm. Da mesma forma, o total de espermatozoides móveis na dose de sêmen, apesar de ter sido menor nas amostras dos touros de baixa fertilidade, apresentou em ambos os grupos valores maiores do que o valor preconizado pelo CBRA (2013) de 10×10^6 espermatozoides móveis na dose de sêmen.

Já nas avaliações funcionais, as amostras de touros de baixa fertilidade apresentaram maior velocidade curvilínea (VCL), menor linearidade (LIN) no movimento e maior deslocamento lateral de cabeça (ALH) do que os touros de alta fertilidade. Isso pode decorrer de processo de hiperativação, descrito por Mortimer & Mortimer (1990), que relaciona-se com capacitação espermática. Neste processo, dentre outras alterações, ocorre aumento da VCL e diminuição da LIN; em bovinos, adaptando-se de Mortimer & Mortimer (1990) em humanos, pode-se considerar que VCL acima de $164,8 \mu\text{m/s}$ e LIN abaixo de 53% caracterizam amostras hiperativadas (MORTIMER; MORTIMER, 1990; JÚNIOR et al., 2018). Nas amostras dos touros de baixa fertilidade do presente estudo foram encontrados estes valores. Com esses resultados, gerou-se a hipótese de que antecipação no horário da inseminação artificial, aproximando-a do momento da ovulação, melhoraria a taxa de fertilidade dos touros BF, já que as amostras destes estavam aparentemente pré capacitadas. Assim, foi realizado este experimento e a diferença entre os touros de alta e baixa fertilidade se manteve (ZANATTA et al., 2017). Em seguida, com base nos exames em todas as partidas dos touros, foram selecionadas as melhores partidas de cada touro de alta e baixa fertilidade considerando a motilidade progressiva, porcentagem de defeitos maiores e menores e porcentagem de espermatozoides PIAIA (membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de

membrana mitocondrial). A avaliação das características espermáticas morfofuncionais não detectou diferenças nesses aspectos nas partidas selecionadas.

Assim sendo, as amostras selecionadas foram submetidas à avaliação do perfil de 380 miRNAs espermáticos; destes, nove miRNAs apresentaram níveis de abundância distintos entre os grupos de alta e baixa fertilidade. A análise de enriquecimento funcional dos genes regulados pelos sete miRNAs (miR-33b, -126-5p, -205, -500, -505, -532 e -542-5p) mais abundantes nos espermatozoides de alta fertilidade mostrou que estes miRNAs estão envolvidos com vias de sinalização importantes para o desenvolvimento embrionário inicial: Wnt, Hedgehog e ErbB; além de estarem envolvidos com processos celulares relacionados à regulação do citoesqueleto e das junções aderentes. As vias de sinalização Wnt e Hedgehog possuem alta regulação no desenvolvimento embrionário inicial estando intimamente relacionadas com processos de proliferação, diferenciação e migração celular (LOGAN; NUSSE, 2004; BRISCOE; THÉRON, 2013; LIU et al., 2014; MOROSAN-PUOPOLO et al., 2014; LEE; ZHAO; INGHAM, 2016). A via de sinalização ErbB também possui importância no desenvolvimento no que tange, principalmente, às malformações cardíacas embrionárias (SANCHEZ-SORIA; CAMENISCH, 2010).

Ainda, foram considerados os miRNAs exclusivamente detectados nos espermatozoides de alta e baixa fertilidade, sendo que os cinco *tops* de cada grupo foram submetidos às análises funcionais. Nos espermatozoides de touros de alta fertilidade, os cinco miRNAs exclusivos mais abundantes relacionaram-se com vias de sinalização do cálcio, MAPK, Wnt e regulação do citoesqueleto. Já nos espermatozoides de touros de baixa fertilidade, os cinco miRNAs exclusivos mais abundantes relacionaram-se com vias de sinalização da ErbB, PI3K-AKT, endocitose e via de sinalização de receptores de células-T. Algumas vias já foram discutidas anteriormente, outras vias, como a via do cálcio, que possui importância nos processos de capacitação espermática e ativação oocitária (SAUNDERS et al., 2002; VISCONTI, 2009), e a via da PI3K-AKT, que possui regulação sobre os processos de proliferação (YU; CUI, 2016), aparecem pela primeira vez e possuem função nos processos ligados com fertilidade e desenvolvimento embrionário.

Após, com o objetivo de entender melhor como estes 19 miRNAs diferencialmente abundantes ou exclusivamente detectados poderiam regular a fertilidade, investigou-se se estes estariam na forma madura nos espermatozoides. Esta avaliação mostrou que os miRNAs avaliados estão em sua maioria na forma imatura nos espermatozoides e que quando aparecem na forma madura não apresentam diferença quanto à abundância. Pelo fato da ação do miRNA ser condicionada a sua forma madura, foi então considerado que esses miRNAs poderiam não

ser importantes para processos moleculares nos espermatozoides. Além disso, esses miRNAs foram investigados em outras partidas dos mesmos touros Angus a fim de entender sobre o efeito da partida. Nesta avaliação, somente dois miRNAs continuaram apresentando abundância diferente e, portanto, parece haver efeito da partida sobre o perfil de miRNAs. Entretanto, esses dois miRNAs, miR-205 e miR-532, continuaram mostrando regulação de genes envolvidos com vias relacionadas à proliferação celular e desenvolvimento embrionário inicial, tais como vias relacionadas ao câncer (proliferação), via de sinalização da Wnt e TGF- β . Por fim, os miRNAs foram avaliados quanto à abundância em partidas de touros Nelore a fim de entender sobre o efeito das raças e somente um miRNA continuou diferentemente expresso. Assim, os miRNAs parecem variar dependendo da origem da amostra avaliada, sendo importante considerar que talvez seja um grupo de miRNAs com funções similares que sejam importantes para a fertilidade e não um único miRNA.

Em seguida, considerada a importância dos miRNAs que apresentaram abundância diferente ou exclusiva nas amostras espermáticas de touros de alta e baixa fertilidade sobre vias relacionadas ao desenvolvimento embrionário, estes foram investigados em embriões gerados com as mesmas amostras espermáticas. Nesta avaliação, os oócitos maduros e embriões partenogênicos foram utilizados como controle. Nos zigotos e oócitos maduros, dois miRNAs apresentaram diferença nos níveis de abundância. Já nos embriões de duas células e oócitos maduros, seis miRNAs apresentaram diferença nesses níveis. Dentre os miRNAs que diferiram em abundâncias nos diferentes estágios, somente um miRNA, o miR-216b, apresentou nível de abundância diferente tanto nos espermatozoides advindos dos touros de alta e baixa fertilidade, quanto nos embriões produzidos com estes espermatozoides. Os outros miRNAs apresentaram abundância distinta entre os embriões (zigotos ou duas células) e os oócitos maduros.

Nos embriões de duas células, ao contrário do que ocorreu nos zigotos, todos os miRNAs com abundância diferente apresentaram maior abundância nos embriões do que nos oócitos. Esse achado sinaliza que possivelmente há transcrição dessas pequenas moléculas entre os estágios de zigoto e duas células, contrariando o que se sabe sobre a ativação do genoma embrionário em bovinos, isto é, de que o início do processo de transcrição nos embriões ocorra no estágio de 8 a 16 células. Entretanto, corroborando nossos resultados, atualmente se sabe que o início da ativação é gradual e precedido por menor transcrição inicial atingindo um pico no estágio de 8 a 16 células (GRAF et al., 2014a). Ainda, dependendo da técnica utilizada, é possível detectar o início da transcrição em embriões bovinos com uma célula, duas células ou quatro células (PLANTE et al., 1994; MEMILI; DOMINKO; FIRST, 1998; MEMILI; FIRST, 1999). Além disso, as vias de sinalização reguladas por esses miRNAs envolvem as vias das

citocinas responsáveis por atrair o sistema imune, MAPK relacionada com amplificação de sinal e via da degradação de RNAs. Assim, sugerimos que o embrião bovino inicia a transcrição no estágio entre uma e duas células das moléculas de miRNAs: miR-126-5p, -339a, -425-3p, -532, -874 e -1225-3p e que essas moléculas atraem o sistema imune com o objetivo de proteger e facilitar a gestação (MOR et al., 2011) e colaboram com o processo de degradação de RNAs refletido na diminuição dos níveis de RNA embrionário até a ativação do genoma embrionário (GRAF et al., 2014b).

Dentre os miRNAs avaliados nos espermatozoides e embriões, o miR-216b foi o único miRNA que apresentou diferença na abundância tanto nos espermatozoides quanto nos zigotos produzidos com estes espermatozoides. Nos embriões de duas células, este miRNA apresentou abundância semelhante entre os grupos. Em sua forma madura, este miRNA foi detectado em seis amostras de zigotos e em duas amostras de embriões de duas células. Esse achado sugere que houve diminuição da forma madura desse miRNA ao longo do desenvolvimento, sem haver diferença na detecção dele nos embriões de duas células dos grupos, sugerindo que a ação deste miRNA associa-se ao estágio de zigoto. Assim, o miR-216b passou a ser considerado um possível regulador do desenvolvimento embrionário inicial, sendo entregue possivelmente pelo espermatozoide ao embrião. Para testar essa nova hipótese, primeiramente foram investigados os níveis de abundância dos genes-alvo deste miRNA nos embriões e, em um segundo experimento, mostramos que de fato este miRNA é entregue do espermatozoide ao embrião por meio de um novo modelo validado no presente estudo.

A seleção dos genes-alvo deste miRNA baseou-se na forte evidência destes genes em serem regulados pelo miR-216b e na importância destes genes em regular o desenvolvimento embrionário inicial. Assim, níveis de abundância de três genes-alvo nos embriões (zigotos e duas células) foram investigados, sendo que somente um deles, o gene *KRAS*, apresentou níveis de abundância diferentes entre os embriões de duas células de alta e baixa fertilidade. Este gene pertence à família de proto-oncogenes *RAS* que está relacionada com proliferação e diferenciação celular, principalmente em processos patológicos associados ao câncer (FERNÁNDEZ-MEDARDE; SANTOS, 2011). Dentre os genes da família, *KRAS* é o único que apresenta importância no desenvolvimento embrionário, sendo que a ausência do gene *KRAS* em camundongos associa-se com deficiências no desenvolvimento e aumento da mortalidade embrionária (JOHNSON et al., 1997; KOERA et al., 1997). Basicamente, o gene *KRAS* sinaliza a tradução da proteína K-RAS que estimula a célula, ao enviar sinais ao núcleo, a se proliferar e diferenciar. O miR-216b é capaz de se ligar à região 3' UTR do gene *KRAS* e diminuir a tradução da proteína K-RAS diminuindo a proliferação e diferenciação celular de

tumores de camundongos (DENG et al., 2011). Segundo a plataforma TargetScanHuman, a região 3' UTR do gene *KRAS* é 100% conservada entre o gene *KRAS* humano, murino e bovino. Do mesmo modo, a sequência do bta-miR-216b (aaaucucugcaggcaaauguga) é 100% homóloga a sequência do mmu-miR-216b-5p (aaaucucugcaggcaaauguga) avaliada pela plataforma miRBase. Dessa forma, espera-se que a regulação do gene *KRAS* nos embriões de duas células esteja sendo feita pelo miR-216b assim como descrita em camundongos. Ainda, devido ao fato dos embriões de duas células de baixa fertilidade terem apresentado menor abundância do gene *KRAS*, espera-se que as taxas de proliferação deste grupo de embriões estejam diminuídas em relação aos embriões de alta fertilidade. Para isso, foram considerados os resultados do estágio de desenvolvimento embrionário avaliados no estudo.

Baseando-se nos resultados de desenvolvimento embrionário, embora as taxas de extrusão do segundo corpúsculo e de blastocisto dos embriões não apresentasse diferença entre os grupos de alta e baixa fertilidade, observamos que os embriões de alta fertilidade apresentaram maiores taxas de primeira clivagem do que os embriões de baixa fertilidade. Além disso, embora não tenha sido observada diferença no diâmetro e nas taxas de proliferação dos blastocistos, o número de células absoluto dos blastocistos de alta fertilidade foi maior do que o número de células dos blastocistos de baixa fertilidade, mesmo não havendo diferença no estágio dos blastocistos classificado em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e eclodido. Tais evidências mostram que possivelmente os embriões de alta fertilidade proliferam mais rapidamente do que os embriões de baixa fertilidade no início do desenvolvimento embrionário, ocorrendo antes do estágio de blastocisto. Essa possível diferença na proliferação, por sua vez, resultou em maior número de células nos blastocistos conforme visto. Em humanos, o aumento do número de células é associado com o sucesso gestacional em embriões transferidos produzidos por ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozoide (KONG et al., 2016). Além disso, blastocistos são capazes de produzir e secretar diferentes fatores, denominados de embriotrofinas, e, consequentemente, modular a abundância de transcritos endometriais por meio da produção de interferon-tau (IFNT), regulação do metabolismo das prostaglandinas e regulação dos canais de aquaporina (SPONCHIADO et al., 2017; WYDOOGHE et al., 2017). Assim, o maior número de células presentes nos blastocistos pode decorrer em maior sinalização de embriotrofinas importantes para o reconhecimento materno da gestação e desenvolvimento embrionário inicial resultando em maior possibilidade de sucesso gestacional conforme proposto no modelo hipotético gráfico exposto na figura 21.

Figura 21 – Modelo hipotético gráfico da regulação do miR-216b e do gene *KRAS* sobre o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos

Fonte: Alves (2018).

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade. O modelo mostra o miR-216b sendo entregue de maneira diferente do espermatozoide dos touros de alta e baixa fertilidade ao zigoto de alta e baixa fertilidade. Em seguida, há o efeito temporal do miR-216b sobre um de seus genes-alvo, o *KRAS*, que apresenta diferentes níveis de abundância nos embriões de duas células de alta e baixa fertilidade. Neste estágio também, há maior taxa de primeira clivagem nos embriões de alta fertilidade do que os embriões de baixa fertilidade. Por fim, os blastocistos de alta fertilidade apresentam maior número de células do que os blastocistos de baixa fertilidade. Esse achado pode implicar na maior ou menor produção e secreção das embriotrofinas resultando em maior sinalização do embrião e maior possibilidade de sucesso gestacional refletido pelas taxas de prenhez a campo.

No segundo experimento, mostramos que o miR-216b é entregue pelo espermatozoide ao embrião e confirmamos os achados do primeiro experimento de que os espermatozoides de touros de alta fertilidade contribuem com menos deste miRNA ao embrião do que os espermatozoides dos touros de baixa fertilidade (Figura 21). Para mostrar que os espermatozoides entregam de fato o miR-216b ao embrião, foi realizada primeiramente a validação do modelo de indução de polispermia com a hipótese de que a abundância do miR-216b é maior nos embriões polispérmicos. Assim, com base na literatura, foram testadas primeiramente a taxa de polispermia utilizando quatro diferentes concentrações espermáticas ($1, 4, 8$ e 16×10^6 espermatozoides/mL) na gota de FIV e notou-se que a partir da concentração de 8×10^6 espermatozoides/mL não houve aumento da taxa de polispermia como observado por Camargo et al. (2002) em touros e Fukuda & Chang (1978) em camundongos. Assim, a concentração de 8×10^6 espermatozoides/mL foi utilizada para a realização da validação e comparação com a taxa de polispermia resultante da inseminação com a concentração controle de 1×10^6 espermatozoides/mL. Nesta validação, o grupo com maior concentração espermática apresentou aumento de 3,77 vezes na taxa de polispermia. Dessa forma, este modelo foi empregado para verificar se haveria aumento na abundância do miR-216b nos zigotos polispérmicos. Os resultados deste experimento mostraram que houve aumento da abundância do miR-216b nos embriões polispérmicos, desconsiderando os grupos de fertilidade, mostrando que, de fato, este miRNA é entregue do espermatozoide ao embrião.

Em um segundo momento, quando a abundância foi avaliada de maneira separada nos embriões polispérmicos e normospérmicos produzidos com os espermatozoides de alta e baixa fertilidade, os zigotos de alta fertilidade polispérmicos apresentaram maior nível de abundância do que os zigotos de alta fertilidade normospérmicos. Entretanto, o nível de abundância deste miRNA nos embriões polispérmicos de baixa fertilidade não diferenciaram dos embriões normospérmicos deste grupo, mas diferenciaram-se dos normospérmicos do grupo de alta fertilidade. Assim, apesar da taxa de polispermia ter sido avaliada para os touros e ter sido similar, pode ter ocorrido variação inerente ao modelo na quantidade de pró-núcleos presentes nos embriões polispérmicos de alta e baixa fertilidade. Além disso, outro fator a ser considerado é de que os embriões normospérmicos do grupo de baixa fertilidade já apresentavam alta abundância do miR-216b e o aumento desta abundância em embriões polispérmicos pode ser muito prejudicial ao desenvolvimento embrionário havendo assim algum mecanismo relacionado ao oócito que pode regular os níveis deste miRNA de modo a evitar que fiquem muito elevados prejudicando o desenvolvimento embrionário inicial. Entretanto, com o presente experimento não foi possível provar qual dos dois processos estão ocorrendo. Mas pode-se mostrar que, assim como o miR-34c em camundongos (LIU et al., 2012), o miR-216b é um miRNA entregue do espermatozoide ao embrião e que apresenta papel importante sobre o desenvolvimento embrionário inicial conforme exposto na figura 21.

3.5. Conclusão

Com este estudo é possível concluir que espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade possuem diferentes perfis de miRNAs. Um destes miRNAs, o miR-216b, é entregue ao embrião pelo espermatozoide, e seus níveis diferem entre zigotos produzidos com sêmen de alta e baixa fertilidade. Essa diferença associa-se com diferenças de abundância de seu gene-alvo, *KRAS*, no embrião de duas células de touros de alta e baixa fertilidade. Tendo em vista as funções de *KRAS* em promover a proliferação e os resultados obtidos da taxa de primeira clivagem e número de células dos blastocistos de touros de alta e baixa fertilidade, acreditamos que o miR-216b, entregue pelo espermatozoide, seja capaz de regular a taxa de proliferação celular inicial dos embriões. Hipotetizamos então que tal regulação reflete-se na quantidade de células dos blastocistos e possivelmente interfere na taxa de sucesso gestacional. Por tudo isso, pode-se considerar que embriões com maior proliferação durante a fase inicial do desenvolvimento, podem resultar em blastocistos com maior número de células que, consequentemente, poderiam resultar na maior produção de fatores de sinalização culminando

3. Capítulo 2: *“Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade contribuem com níveis diferentes de miR-216b ao embrião regulando de maneira diferente o desenvolvimento embrionário inicial”*

em maior chance em ter sucesso da prenhez conforme exposto na figura 21. Dessa forma, neste estudo, prova-se um novo mecanismo de regulação do desenvolvimento embrionário inicial em bovinos mediado pelo miR-216b presente em diferentes níveis de abundância em espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade. Mostra-se ainda que a entrega deste miRNA e a contribuição para o desenvolvimento embrionário inicial são feitas pelo espermatozoide.

4. CAPÍTULO 3: “O ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR ALTERA O PERFIL DE MIRNAS ESPERMÁTICOS”

4.1. Introdução

O estresse térmico, ocasionado principalmente pelo aumento da temperatura ambiental, afeta drasticamente os processos reprodutivos (HANSEN, 2009). Este estresse resulta em diminuição do potencial fértil, podendo levar à infertilidade tanto em fêmeas como em machos (AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999; FERNANDES et al., 2008; PAUL et al., 2008). Em machos, a afecção reprodutiva mais comum ocasionada pelo aumento da temperatura dos órgãos reprodutivos é a degeneração testicular (MOULE; WAITES, 1963). Em levantamento realizado no Brasil, o processo foi descrito como a maior causa de infertilidade em touros e garanhões (VALE FILHO et al., 1974; ALVARENGA; PAPA, 2009). A degeneração testicular ocorre durante a varicocele, anormalidade mais comum em homens, que resulta na diminuição da fertilidade (AGARWAL; ESTEVES, 2016; HASSANIN; AHMED; KADDAH, 2018). De fato, a degeneração apresenta alta prevalência, pois pode ser ocasionada por diversos processos que decorram no aumento de temperatura testicular tais como aumento da temperatura ambiental, traumas escrotais, processos febris, entre outros (HANSEN, 2009).

Em humanos e em animais de produção, para que a espermatogênese ocorra de maneira ideal é necessário que a temperatura testicular esteja de 2 a 6° C abaixo da temperatura corporal (KASTELIC et al., 1996; KASTELIC; COOK; COULTER, 1996; ALVES et al., 2016a), o que se denomina de termorregulação testicular. Embora a etiopatogenia da degeneração testicular tenha sido questionada recentemente (KASTELIC et al., 2017), até o momento acredita-se que a perda da termorregulação testicular, ocasionada pelo aumento da temperatura testicular, ocasiona aumento do metabolismo celular sem aumento na oxigenação testicular levando à hipóxia (PAUL et al., 2008; PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009). Essa condição resultará em estresse oxidativo das células presentes no epitélio seminífero, o que pode levar a prejuízos na qualidade espermática como queda de motilidade, aumento da porcentagem de espermatozoides anormais, danos ao DNA espermático e diminuição na concentração sérica de testosterona (ALVES et al., 2015, 2016a). Ao fim do processo, a espermatogênese será afetada em diferentes níveis, dependendo da gravidade de acometimento do parênquima. A qualidade do sêmen é prejudicada até que se reestabeleça a linhagem espermática novamente (PAUL et al., 2008; ALVES et al., 2016b, 2016a).

Basicamente, a espermatogênese constitui-se em processo altamente regulado em que uma célula pouquíssimo diferenciada, a espermatogônia, é capaz de gerar espermátócitos, que, por sua vez, geram espermátides, que se diferenciam em espermatozoides. Todo esse processo é finamente regulado por fatores moleculares inclusive por miRNAs (JAN et al., 2012; KOTAJA, 2014; STAUB; JOHNSON, 2018). Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA, não codificadoras de proteínas altamente conservadas entre as espécies, que possuem ação pós-transcricional interferindo sobre o processo de tradução de proteínas (BARTEL, 2018) e que são essenciais para a condição de homeostase do organismo (HASSANIN; AHMED; KADDAH, 2018). Essas moléculas estão presentes em todas as células da linhagem espermática inclusive nos espermatozoides (SONG et al., 2009; SMORAG et al., 2012; SHARMA et al., 2015). A inibição da biossíntese de miRNAs no epitélio seminífero por meio de modelos *knock-out* de uma de suas enzimas de processamento, a *Dicer*, decorre em distúrbios na espermatogênese e infertilidade (PAPAIOANNOU et al., 2009). Nos epidídimos, os miRNAs são transmitidos do epitélio epididimário para os espermatozoides por meio dos exossomos (BELLEANNÉE et al., 2013; SHARMA et al., 2018). Essas vesículas exossomais de tamanho entre 50 a 250 nm também estão presentes nos fluidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias e fazem parte do plasma seminal (SULLIVAN; SAEZ, 2013; SULLIVAN, 2015). Dessa forma, embora o conteúdo de miRNAs das vesículas exossomais presentes no epidídimo seja conhecido e os miRNAs possuam função na regulação da espermatogênese, pouco se sabe como o estresse térmico testicular pode impactar os níveis destas moléculas nos espermatozoides e exossomos.

Dentre os processos que ocorrem durante o estresse térmico testicular está a hipóxia tecidual; em tumores, a hipóxia pode levar à diminuição da síntese de miRNAs (SHEN et al., 2013). Em processos reprodutivos, houve diminuição da abundância do miR-15a associada com o aumento da abundância da proteína de choque térmico HSPA1B em espermatozoides de homens com varicocele (JI et al., 2014). Em testículos de macacos submetidos ao aumento de temperatura, embora 11 miRNAs apresentassem aumento de abundância, houve diminuição da abundância de 13 miRNAs, dentre eles os miR-34c e -449b (SAKURAI et al., 2016), presentes em espermatozoides e importantes na regulação da fertilidade (LIU et al., 2012; WANG et al., 2017). Entretanto, a relação dos distúrbios da espermatogênese com alterações no perfil dessas pequenas moléculas ainda é pouco conhecida. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi descrever os miRNAs espermáticos e exossomais que são alterados frente ao estresse térmico testicular em touros. Para isso, foi investigada a alteração do perfil de miRNAs promovida por meio da colocação de bolsas insuladoras escrotais. Com este estudo espera-se gerar

conhecimento sobre o conteúdo de miRNAs espermáticos e exossomais alterados frente a estresse na espermatogênese. Com isso, pretende-se contribuir para o melhor entendimento da ação dessas moléculas sobre a espermatogênese e assim colaborar para a geração de novas terapias e novos métodos diagnósticos de distúrbios na reprodução.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Reagentes

Quando não mencionada a origem, as soluções e reagentes químicos utilizados foram provenientes da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As sondas fluorescentes utilizadas para a análise espermática foram: Hoescht 33342 (HOE 33342; código H1399, Thermo Fisher Scientific); iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma-Aldrich); iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1; T3168, Thermo Fisher Scientific); e aglutinina obtida de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA; L0770, Sigma-Aldrich).

4.2.2. Declaração de ética

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados de acordo com os princípios éticos de pesquisa animal adotados pela “Comissão de Ética no Uso de Animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) sob o número 1912050516.

4.2.3. Esquema experimental

Para a realização deste experimento, seis touros da raça Nelore (*Bos indicus*) foram utilizados, sendo três mantidos no grupo controle (CO) e três submetidos ao estresse térmico (grupo *heat stress*; HS; n=3), por meio da colocação de bolsas insuladoras escrotais como modelo indutor de danos à espermatogênese. As bolsas foram mantidas durante 96 horas. As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de eletroejaculador modelo Autojac® (Neovet, Uberaba, Brasil) sete dias antes da colocação das bolsas (D-7) e 21 dias após a colocação das mesmas (D+21). O sêmen foi avaliado quanto às características morfofuncionais e quanto ao perfil de miRNAs dos espermatozoides e dos exossomos presentes no plasma seminal.

As atividades relacionadas à colheita das amostras e avaliações espermáticas foram realizadas nos Laboratórios de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) e de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As atividades experimentais relacionadas às avaliações moleculares foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

4.2.4. Avaliações espermáticas morfofuncionais

Para as avaliações espermáticas, o sêmen foi colhido em tubos de 15 mL pré-aquecidos a 37° C e protegidos da luz. Após a colheita, os tubos foram enviados ao laboratório e colocados em banho-maria a 37° C. Previamente às análises, o volume de 2,5 mL do sêmen foi pipetado em tubo separado e destinado para o preparo de obtenção dos espermatozoides e exossomos para as análises moleculares. Em seguida, iniciaram-se as análises morfofuncionais que consistiram nas análises convencionais de motilidade subjetiva, vigor, concentração espermática e morfologia; e nas análises funcionais de integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial pela microscopia de fluorescência.

As avaliações espermáticas morfofuncionais foram realizadas por um único técnico. Para a análise da motilidade espermática total (%) e do vigor espermático (escore 1-5; sendo 1 o movimento exclusivamente oscilatório e 5 o movimento progressivo retilíneo e muito rápido), 4 µL do sêmen foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados por meio de microscopia de contraste de fase (Modelo E200, Nikon, Tóquio, Japão), em aumento de 100x com diluição prévia do sêmen em meio TALP *sperm* (4,2 mg/mL de cloreto de sódio, 1,87 mg/mL de cloreto de potássio, 2,1 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de fosfato de sódio, 290 µg/mL de cloreto de cálcio monohidratado, 80 µg/mL de cloreto de magnésio hexahidratado, 6,5 mg/mL de Hepes) suplementado com albumina, lactato de sódio, piruvato de sódio e penicilina-estreptomicina (BAVISTER; LORRAINE, 1983). Em seguida, a concentração espermática foi avaliada utilizando prévia diluição (1:200) em solução salina tamponada contendo 4% de formaldeído por meio da técnica da câmara de Neubauer. A contagem dos espermatozoides foi feita em aumento de 400x em microscopia de contraste de fase (Modelo E200, Nikon, Tóquio, Japão). Respeitou-se a diluição prévia para o cálculo da concentração de espermatozoides.

A análise da porcentagem de espermatozoides anormais foi feita fixando-se a amostra espermática em solução salina tamponada contendo 4% de formaldeído previamente aquecida

a 37° C. Para a avaliação da morfologia espermática, foram analisadas 200 células sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 1.000x. As células foram classificadas de acordo com Blom (1973) em defeitos maiores [defeitos de acrossomo; gota protoplasmática proximal; teratológicas; *pouch formation*; defeitos de cabeça (subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal e contorno anormal); defeitos de peça intermediária; defeitos de cauda (enrolada na cabeça, fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota)], defeitos menores [gota protoplasmática distal, defeitos de cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal); inserção da cauda anormal (oblíqua, retroaxial e abaxial)] e defeitos totais (soma dos maiores e menores).

Por fim, a análise funcional realizada foi a de avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial por microscopia de fluorescência. Para isso, ajustou-se a concentração espermática para $10 \cdot 10^6$ espermatozoides/mL em meio TALP *sperm*. Em seguida, foi adicionado ao volume de 150 µL do sêmen diluído, 2 µL de HOE 33342 0,5 mg/mL, 2 µL de IP 0,5 mg/mL, 3 µL de JC-1 153µM e 20 µL de FITC-PSA 100µg/mL. Após a adição das sondas fluorescentes, as amostras foram incubadas por 8 minutos a 37° C. Em seguida, foram montadas as lâminas e foram avaliadas 200 células por microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). Os espermatozoides foram classificados de acordo com a fluorescência emitida em: porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (células PIAIA), porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (PI), porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (AI) e porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial (AP) de acordo com Celeghini et al. (2007).

4.2.5. Obtenção dos espermatozoides

A obtenção dos espermatozoides livres de células somáticas foi realizada a partir do mini gradiente de Percoll. Para isso, o sêmen *in natura* foi previamente diluído para a concentração de $100 \cdot 10^6$ espermatozoides/mL com diluidor de sêmen Botubov® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Em seguida, o mini gradiente de Percoll foi preparado (45 e 90%;

Apêndice B) e adicionado então 200 µL de sêmen. Após, o mini gradiente com o sêmen foi centrifugado a 3600g por 7 minutos. Em seguida, retirou-se o sobrenadante, e o *pellet* de espermatozoides foi ressuspensionado em 500 µL de dPBS (10 mg/mL de cloreto de sódio, 0,2 mg/mL de cloreto de potássio, 1,44 mg/mL de fosfato de sódio dibásico e 0,24 mg/mL de fosfato de potássio) sendo centrifugado por 520g durante 5 minutos. Por fim, foi retirado o sobrenadante e a ele foi adicionado 750 µL de TRIZOL[®] LS Reagent (Life Technologies, Califórnia, EUA) e 8 µL de *Polyacryl*[®]. Em seguida, a solução foi armazenada a -80° C.

4.2.6. Obtenção e avaliações dos exossomos

Para a obtenção dos exossomos, o sêmen foi centrifugado à 700g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado e novamente centrifugado por duas vezes à 4.000g por 20 minutos para remoção de qualquer debris celular. Por fim, foi realizada a centrifugação a 16.500g por 30 minutos. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi submetido a duas ultracentrifugações de 120.000g a 4° C durante 70 minutos cada. Ao final da última ultracentrifugação, foi adicionado dPBS ao pellet e homogeneizado. Deste volume, foram retiradas alíquotas para diluição 1:500 em dPBS destinadas para a análise do tamanho e concentração das vesículas. O volume restante foi utilizado para a extração de RNA.

4.2.7. Caracterização dos exossomos

Após a obtenção e antes de prosseguir as análises moleculares, os exossomos foram caracterizados por meio da visualização dos mesmos em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e pela quantificação do tamanho e concentração das vesículas exossomais obtidas.

Primeiramente, para a visualização dos exossomos por MET, amostras de plasma seminal foram submetidas ao mesmo protocolo descrito anteriormente para a obtenção dos exossomos e ao final, o pellet de exossomos obtido foi fixado com solução fixadora (2,5% de glutaraldeído com 0,1 M de cacodilato e paraformaldeído a 4% - pH 7,2 a 7,4) por duas horas em temperatura ambiente. Ao final, a solução foi submetida à terceira ultracentrifugação de 120.000g a 4° C durante 70 minutos. Ao final, o pellet de exossomos fixado foi ressuspensionado em água ultrapura e novamente ultracentrifugado por 120.000g a 4° C durante 70 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 µL de água ultrapura e o material foi colocado em grade de cobre revestida com *pioloform* por cinco minutos. O excesso de material foi retirado com papel filtro e a grade foi imediatamente colocada em gota de acetato de uranila aquosa a 2% por três

minutos. Retirou-se o excesso de solução novamente com papel filtro e a leitura foi feita em microscópio eletrônico de transmissão (FEI de 200kV modelo Tecnai20 emissor LAB6).

Para a quantificação do tamanho e concentração dos exossomos na amostra, foi utilizado o equipamento NanoSight® NS300 e o programa de análise NanoSight NTA software v 3.1 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). As amostras foram previamente diluídas a 1:500 e após foram inseridas no equipamento. Os vídeos das partículas foram gravados com a câmera em nível 14, ganho 2, temperatura de 38,5° C, sendo o foco ajustado para cada amostra. Foram gravados 5 vídeos de 30 segundos para cada amostra, sendo feito o cálculo pelo programa da média e da moda do tamanho das partículas e também da média da concentração das partículas nos vídeos gravados sendo para isso respeitada a diluição prévia da amostra. Previamente às análises, o equipamento foi calibrado com soluções de 50 nm, 100 nm e 150 nm (Beads, Malvern, Reino Unido).

4.2.8. Análise de miRNAs dos espermatozoides e exossomos

Para a realização da extração de RNA, foi utilizado o kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo-se as recomendações do fabricante. O RNA total obtido foi mensurado no NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), sendo aferida também a relação 260/280 para mensurar a qualidade do RNA total obtido. Somente foram admitidas amostras com relação $\geq 1,80$. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit miScript® RT Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo a recomendação do fabricante adicionando aproximadamente 100 ng de RNA total a 2 μ L de 5x HiFlex *buffer*, 2 μ L de 10x mix de ácidos nucleicos e 1 μ L da enzima transcriptase reversa. A reação de volume final de 10 μ L de cDNA foi colocada no termociclador e incubada a 37° C durante 1 hora e a 95° C durante 5 minutos para a inativação da enzima. Ao final, a amostra de cDNA foi mantida a 4° C sendo colocada em gelo. Por fim, para o PCR em tempo real, foi adicionado o volume de 1 μ L de *primer* a 10 μ M em cada poço, sendo pipetados 380 miRNAs (Apêndice C) com auxílio de pipeta multicanal. Para o preparo da amostra para o PCR, foi utilizado o kit miScript SYBR Green® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para isso, foi misturado 10 μ L de cDNA, 578 μ L de água ultrapura, 252 μ L de primer universal e 1260 μ L de SYBR Green®. A solução foi preparada e mantida protegida da luz. Em seguida, foi adicionado 5 μ L da solução Mix a cada poço com auxílio de pipeta automática. Por fim, a placa foi colocada no aparelho de PCR em tempo real QuantStudio™ 6 Flex (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA).

O protocolo de qPCR seguiu uma incubação inicial de 95° C durante 15 minutos (*Hold stage*), seguida por 45 ciclos de incubação primeiramente a 94° C por 15 segundos, após de 55° C por 30 segundos e por fim de 70° C por 30 segundos (*PCR stage*). Por fim, foi feita a curva de *melting*. Para confirmar a amplificação de produtos de cDNA, a curva de *melting* foi avaliada de cada miRNA. Além disso, os miRNAs só foram considerados como detectados quando a curva de amplificação destes teve início antes do ciclo 38. Os miRNAs endógenos utilizados foram o bta-miR-99b e bta-miR-425-5p para os espermatozoides e bta-miR-99b para os exossomos que foram escolhidos com base no programa NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTTOFT, 2004; MESTDAGH et al., 2009; FAGERLIND et al., 2015).

4.2.9. Análise de enriquecimento funcional

Para a análise de enriquecimento funcional, os miRNAs que apresentaram abundância diferente entre os grupos foram investigados quanto aos genes-alvos preditos pela plataforma TargetScanHuman (http://www.targetscan.org/vert_72/). Em seguida, foram identificados os 80 primeiros da lista de acordo com De Bem et al. (2017) e todos os genes em conjunto e de maneira simultânea foram analisados pela plataforma David – Functional Annotation Tool (David Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH; <https://david.ncifcrf.gov/>). Em seguida, as vias de sinalização foram ranqueadas de acordo com o escore de enriquecimento e número de genes envolvidos.

4.2.10. Análise estatística

Para a análise estatística foram considerados dois grupos (controle x HS) e dois tempos. Os dados da qPCR obtidos como ΔC_t foram normalizados pela média geométrica dos genes endógenos. Os dados normalizados e os demais dados obtidos no experimento foram previamente verificados quanto à normalidade dos resíduos e, após retirada de *out-liers* ou transformação dos dados, quando necessário, estes foram submetidos à análise de variância utilizando procedimento *Mixed* do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 9.3) adicionado o comando *Repeated* para verificar o efeito de tempo. O nível de significância considerado será de 5%. Para a apresentação dos dados sob a forma de expressão relativa, os dados normalizados foram transformados em $2^{-\Delta C_t}$. Esses dados também foram usados para a análise e geração de imagens de Heatmap usando o programa Metaboanalyst 3.0.

4.3. Resultados

Em relação às características espermáticas morfofuncionais avaliadas, os touros do grupo HS apresentaram maior quantidade de anormalidades espermáticas, apresentando maior porcentagem de defeitos espermáticos maiores e totais 21 dias após o estresse conforme exposto na tabela 17. Embora a motilidade subjetiva, o vigor e a porcentagem de espermatozoides com integridade de membranas plasmática, acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial tenham apresentado aparente queda e a porcentagem de espermatozoides com defeitos menores tenha apresentado aparente aumento nos touros do grupo HS 21 dias após o estresse (Tabela 17), estas características foram semelhantes entre os animais HS e controle.

A avaliação do perfil de 380 miRNAs espermáticos revelou que 21 miRNAs apresentaram diferentes níveis de abundância quando comparados entre os grupos controle e HS 21 dias após o estresse (Figura 22). Estes 21 miRNAs apresentaram o mesmo nível de abundância antes do estresse. Dentre esses miRNAs, 18 miRNAs (bta-miR-9-5p, -15a, -18a, -20b, -30a-5p, -30b-5p, -30d, -30e-5p, -34b, -34c, -106b, -126-5p, -146a, -191, -192, -200b, -335 and -449a) apresentaram menor abundância e três miRNAs (bta-miR-454, -378d and -1246) apresentaram maior abundância nos espermatozoides dos animais HS. Dentre os que apresentaram menor abundância, a análise de enriquecimento funcional envolvimento com as vias Wnt, Hippo, p53, miRNAs no câncer, MAPK e vias que regulam a pluripotência conforme a figura 23.

Tabela 17 - Média e erro padrão da média das características espermáticas convencionais e funcionais de touros submetidos ao estresse térmico testicular (grupo *Heat stress*) ou não (grupo controle) considerando as avaliações espermáticas feitas sete dias antes (D-7) e 21 dias após (D+21) ao estresse

	Controle		Heat Stress		CO ¹	HS ²	Trat	Tempo	Trat* Tempo
	D-7	D+21	D-7	D+21					
Características convencionais									
Motilidade subjetiva (%)	66,66±3,33	71,66±1,66	68,33±4,40	28,33±20,88	69,16±2,00	48,33±13,08	0,11	0,17	0,09
Vigor (1-5)	2,66±0,33	3,33±0,33	3,33±0,44	2,50±0,50	3,00±0,25	2,91±0,35	0,84	0,84	0,10
Concentração (x10 ⁶ sp/mL)	357,50±178,75	201,66±30,86	330,83±148,19	104,16±25,34	279,58±88,29	217,50±84,20	0,62	0,17	0,77
Defeitos maiores (%)	5,50±2,46 ^b	1,83±0,88 ^b	4,66±0,60 ^b	65,66±7,42 ^a	3,66±1,42	35,16±14,04	0,0005	0,0008	0,0005
Defeitos menores (%)	1,00±0,57	1,33±0,44	2,33±0,88	12,16±6,12	1,66±0,33	7,25±3,53	0,11	0,17	0,19
Defeitos totais (%)	6,50±3,04 ^b	3,16±0,92 ^b	7,00±0,28 ^b	77,83±3,08 ^a	4,83±1,60	42,41±15,89	0,001	<0,001	<0,001
Integridade de membranas e função mitocondrial									
PIAIA ³ (%)	71,33±9,40	73,11±7,20	75,66±5,32	41,66±19,97	72,22±5,31	58,66±11,97	0,28	0,21	0,17
Integridade de membrana plasmática (%)	78,50±8,73	69,08±1,21	78,33±6,30	47,33±22,09	73,79±4,47	62,83±12,39	0,39	0,13	0,40
Integridade de membrana acrossomal (%)	90,50±2,75	76,58±3,54	87,00±3,04	64,16±16,99	83,54±3,70	75,58±9,25	0,41	0,10	0,64
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	79,66±5,35	73,75±1,98	83,16±6,58	63,66±6,61	76,70±2,87	73,41±6,03	0,58	0,07	0,27

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹CO: grupo controle; ²HS: grupo *heat stress*; Trat: tratamento; Trat*Tempo: interação tempo*tratamento; ³PIAIA: espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial.

Figura 22 – Análise de Heatmap e dendrograma não supervisionados dos 21 miRNAs diferentemente abundantes nos espermatozoides dos touros controle (CO) e submetidos ao estresse térmico testicular (grupo *heat stress* -HS)

Fonte: Alves (2018).

Legenda: CO: controle; HS: grupo *heat stress*;

A caracterização dos exossomos revelou que o isolamento dos exossomos foi feito com sucesso. Na figura 24 é possível notar a presença de diversas vesículas exossomais isoladas após o procedimento de ultracentrifugação do plasma seminal dos touros. As avaliações pelo NanoSight® revelaram que o tamanho médio das vesículas isoladas do plasma seminal tanto dos animais do grupo controle quanto do grupo HS independentemente do tempo de coleta foi de $173,50 \pm 5,50$ nm, sendo a moda, ou seja, os tamanhos que mais apareceram na análise de $137,58 \pm 6,40$ nm.

Figura 23 – Análise de enriquecimento funcional dos genes-alvo dos miRNAs miR-9-5p, -15a, -18a, -20b, -30a-5p, -30b-5p, -30d, -30e-5p, -34b, -34c, -106b, -126-5p, -146a, -191, -192, -200b, -335 and -449a que apresentaram menor abundância nos espermatozoides dos touros submetidos ao estresse térmico testicular

Fonte: Alves (2018).

Figura 24 – Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de vesículas exossomais isoladas do plasma seminal dos touros por meio de ultracentrifugação

Fonte: Alves (2018).

Legenda: As setas indicam a presença de vesículas exossomais encontradas na amostra por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

Em relação à variação do tamanho das vesículas exossomais isoladas no plasma seminal dos animais dos grupos controle e HS, os grupos não diferiram para a média do valor dos tamanhos das vesículas nem para a moda. A concentração das vesículas também não apresentou diferença entre os grupos conforme mostra a tabela 18. A avaliação do perfil de 380 miRNAs presentes nas vesículas exossomais mostrou que não houve diferença de abundância entre os miRNAs presentes nas vesículas exossomais do plasma seminal dos animais dos grupos

4. Capítulo 3: “O estresse térmico testicular altera o perfil de miRNAs espermáticos”

controle e HS 21 dias após o estresse, sendo que os miRNAs bta-miR-130a, -212 e -371 apresentaram $0,05 \geq P > 0,10$.

Tabela 18 - Média e erro padrão da média das características das vesículas exossomais isoladas do plasma seminal de touros submetidos ao estresse térmico testicular (grupo *heat stress*) ou não (grupo controle) considerando as avaliações espermáticas feitas sete dias antes (D-7) e 21 dias após (D+21) ao estresse

	Controle		<i>Heat Stress</i>		¹ CO	² HS	Trat	Tempo	Trat* Tempo
	D-7	D+21	D-7	D+21					
Média (nm)	159,90±4,62	184,46±8,49	182,03±17,11	167,60±8,61	172,18±6,99	174,81±9,15	0,81	0,64	0,10
Moda (nm)	128,76±5,84	138,10±6,88	134,86±21,63	148,60±15,80	133,43±4,54	141,73±12,36	0,57	0,43	0,88
Concentração (x10 ⁹ /mL)	375,66±99,98	868,00±334,80	882,66±444,76	461,33±217,14	621,83±191,10	672,00±240,55	0,87	0,90	0,17

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹CO: controle; ²HS: grupo *heat stress*; Trat: tratamento; Trat*Tempo: interação tempo*tratamento.

4.4. Discussão

O presente estudo teve por objetivo investigar os miRNAs espermáticos que são alterados frente ao estresse térmico testicular com o propósito de entender melhor como os miRNAs espermáticos são regulados durante a espermatogênese. Para isso, três touros foram submetidos ao estresse térmico testicular por meio da colocação de bolsas insuladoras. Este procedimento visa induzir o estresse térmico local e vem sendo utilizado por diversos grupos com muito sucesso (BRITO et al., 2003; GARCIA, 2004; ALVES et al., 2016a). As bolsas insuladoras evitam que ocorra a troca de temperatura da superfície escrotal com o meio externo fazendo com que a temperatura interna testicular fique similar à temperatura interna corporal (ALVES et al., 2016a). Em carneiros, após 21 dias da retirada das bolsas insuladoras, há queda da qualidade espermática caracterizada pela diminuição da motilidade total, da motilidade progressiva, da velocidade progressiva (VSL), da velocidade de trajeto (VAP), da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial e aumento da porcentagem de espermatozoides anormais e com fragmentação de DNA (ALVES et al., 2016a). Em touros, 21 dias após a retirada das bolsas há queda da fertilidade com diminuição das taxas de blastocisto (FERNANDES et al., 2008). Dessa forma, tendo em vista estes achados e, também, levando em consideração que o trânsito epididimário dura de 3 a 12 dias (SULLIVAN et al., 2005), no presente estudo os touros submetidos ao estresse térmico testicular tiveram o sêmen coletado 21 dias após o estresse com o objetivo de entender melhor quais miRNAs estariam alterados nas células espermáticas destes touros relacionados ao estresse testicular. Em relação às características espermáticas, corroborando Alves et al. (2016a) e Fernandes et al. (2008), houve aumento da porcentagem de espermatozoides com defeitos espermáticos maiores, que são aqueles que têm grande efeito sobre a fertilidade (BLOM, 1973). Para as outras características espermáticas, apesar de terem apresentado aparente aumento ou diminuição, não foi observada diferença para as características dos animais controle.

Tendo em vista a caracterização feita no tocante à qualidade espermática, esperava-se que poucos miRNAs fossem diferentemente abundantes entre os grupos. De fato, observamos que 21 miRNAs de um perfil de 380 foram diferentemente abundantes nos espermatozoides dos touros controle e submetidos ao estresse térmico testicular (HS). Entretanto, a análise de enriquecimento destes 21 miRNAs mostrou que os 18 miRNAs menos abundantes no grupo HS estão envolvidos na regulação de genes que modulam vias de sinalização importantes relacionadas à proliferação celular, apoptose e desenvolvimento embrionário: Wnt, Hippo, p53, miRNAs no câncer, MAPK e vias que regulam a pluripotência.

Ainda, 85,5% dos miRNAs diferentemente abundantes estão diminuídos no grupo de touros HS, corroborando o fato de que o processo de hipóxia causa diminuição da síntese de miRNAs (SHEN et al., 2013). Esta diminuição ocorre por haver aumento da ligação de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) à proteína Argonauta, levando à sua fosforilação, à diminuição da sua ligação com a enzima *Dicer* de processamento de miRNAs e à inibição da formação do complexo de silenciamento RISC (*RNA-induced silencing complex*) diminuindo assim a presença de miRNAs na célula (SHEN et al., 2013). Além disso, grande parte destes miRNAs possui importância em processos reprodutivos e já foram associados a baixa qualidade espermática e/ou infertilidade. No presente estudo, o miR-34c apresentou diminuição de abundância nos espermatozoides dos touros frente ao estresse térmico testicular. Da mesma forma, em testículos de macacos submetidos ao estresse térmico, em plasma seminal de homens com azoospermia (ausência de espermatozoides no ejaculado) e em espermatozoides de homens com oligoastenozoospermia (baixas concentração e motilidade espermáticas), este miRNA também apresentou diminuição da abundância (WANG et al., 2011; ABU-HALIMA et al., 2013; SAKURAI et al., 2016). O miR-34c é de fato importante para a espermatogênese (SMORAG et al., 2012; WANG et al., 2018) e está presente em espermatozoides bovinos (TSCHERNER et al., 2014) e murinos (LIU et al., 2012). Ademais, em camundongos, apresenta papel fundamental sobre o desenvolvimento embrionário inicial, visto que na ausência deste miRNA há diminuição das taxas de clivagem (LIU et al., 2012). Além do miR-34c, os miR-34b, -200b e -449a, que apresentaram menor abundância nos espermatozoides, também apresentaram menor abundância nos testículos dos macacos submetidos ao estresse térmico testicular (SAKURAI et al., 2016). Outro miRNA que deve ser destacado, é o miR-15a. No presente estudo, este miRNA aparece diminuído nos espermatozoides dos touros estressados. Da mesma forma, em espermatozoides de homens com varicocele observou-se diminuição da abundância deste miRNA que regula a abundância da proteína de choque térmico HSPA1B (JI et al., 2014). Sendo assim, no presente estudo, podemos mostrar que mesmo um estresse não tão severo sobre a espermatogênese pode alterar o perfil de miRNAs importantes para a qualidade espermática e fertilidade.

No tocante ao isolamento dos exossomos, nota-se que este foi realizado com sucesso conforme visto nas imagens obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão. Nas análises do tamanho, tanto a média quanto a mediana apresentaram valores entre 50 a 250 nm, tamanho esperado de exossomos presentes no plasma seminal (SULLIVAN, 2015). A comparação do tamanho e a concentração das vesículas exossomais entre os grupos controle e HS mostrou que estes foram semelhantes entre os dois grupos, concluindo-se que após 21 dias de cessado o

estresse térmico, este não é capaz de interferir nessas características. Da mesma forma, o perfil de miRNAs exossomais não apresentou diferença entre os touros estressados e não estressados. De fato, os exossomos são em sua maioria liberados por células presentes no epitélio epididimário, sendo alguns também liberados por células das glândulas sexuais acessórias (SULLIVAN; SAEZ, 2013). Entretanto, levando em consideração que o trânsito epididimário dura entre 3 e 12 dias (SULLIVAN et al., 2005), era esperado que não fosse encontrado efeito do estresse térmico sobre o tamanho e conteúdo de miRNAs presentes nessas vesículas.

4.5. Conclusão

Com o presente estudo é possível concluir que miRNAs espermáticos importantes para a fertilidade são alterados por meio do estresse térmico testicular. Não foram encontradas alterações no tamanho e perfil de miRNAs dos exossomos coletados 21 dias após o estresse, mostrando que a alteração detectada nos espermatozoides provavelmente advinha do distúrbio provocado sobre a espermatogênese. Esses achados contribuem para a geração de conhecimento a cerca da importância dos miRNAs na espermatogênese de touros e também da modulação do conteúdo de miRNAs espermáticos pelo estresse térmico testicular possibilitando a geração de novos métodos diagnósticos e terapêuticos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, no Brasil, as inseminações artificiais em tempo fixo correspondem a 85% das inseminações realizadas no país. O alto emprego desta biotécnica, associado com o ganho de produtividade obtido, vem exigindo que melhorias sejam feitas principalmente no que tange às taxas médias de prenhez que, atualmente, correspondem a 52% (BARUSELLI et al., 2018). Com esse objetivo, diversos grupos têm se empenhando em intensificar o uso da biotécnica e melhorar seus resultados otimizando protocolos hormonais (BARUSELLI et al., 2004; PUGLIESI et al., 2016; FERREIRA et al., 2018), otimizando o manejo (MARQUES; et al., 2018) e melhorando o processamento do sêmen (CELEGHINI et al., 2008; FORERO-GONZALEZ et al., 2012; TARRAGÓ, 2017). Entretanto, embora diversos aspectos sejam estudados a fim de incrementar as taxas de prenhez, pelo fato da fertilidade ser multifatorial, poucos estudos chegam num consenso sobre qual característica espermática apresenta maior poder de prever a fertilidade. Dessa forma, tendo em vista esta questão, nosso grupo por meio deste trabalho propôs investigar moléculas diferentes entre amostras de animais com alto e baixo potencial reprodutivo. Para isso foram traçadas duas diferentes estratégias: a primeira em que o perfil de miRNAs foi investigado em espermatozoides e embriões de touros com alta e baixa fertilidade a campo que não apresentaram diferenças na qualidade espermática; e a segunda em que foi investigado o perfil de miRNAs espermáticos e exossomais de touros em que danos à espermatogênese foram induzidos. Dessa forma, buscou-se encontrar quais miRNAs apresentavam-se alterados nos dois modelos e entender como esses miRNAs atuam sobre os processos reprodutivos.

No primeiro estudo, foram descritos nove miRNAs com diferentes níveis de abundância nos espermatozoides dos touros de alta e baixa fertilidade e dez miRNAs que se apresentaram exclusivos e com alta abundância nos espermatozoides de touros de alta ou de baixa fertilidade. Dentre estes 19 miRNAs (let-7b, miR-33b, -126-5p, -137, -146a, -146b, -147, -148a, -195, -205, -216b, -339a, -425-3p, -500, -505, -532, -542-5p, -874 e -1225-3p), destacaram-se os miR-205 e -532 por serem mais abundantes também em outras partidas dos mesmos touros de alta fertilidade; o miR-339a por ser menos abundante em amostras de touros Nelore de alta fertilidade assim como foi em amostras dos touros Angus de alta fertilidade; e o miR-216b por apresentar importância no desenvolvimento embrionário inicial e ser entregue dos espermatozoides ao embrião. No segundo estudo, 21 miRNAs (miR-9-5p, -15a, -18a, -20b, -30a-5p, -30b-5p, 30d, 30e-5p, -34b, -34c, -106b, -126-5p, -146a, -191, -192, -200b, -335, -378d, -449a, -454 e -1246) apresentaram diferença nos níveis de abundâncias entre os

espermatozoides dos touros controle e submetidos ao prejuízo sobre a espermatogênese. Os miR-15a, -34b, -34c, -200b e -449a se destacaram por também terem sido associados com o estresse térmico testicular e varicocele em outras espécies, sendo que um deles, o miR-34c já foi descrito como importante para a espermatogênese e também para o desenvolvimento embrionário inicial de camundongos.

Ainda, com base nos resultados obtidos, podemos notar que dois miRNAs (miR-126-5p e -146a) foram detectados em ambos os estudos. No primeiro estudo, o miR-126-5p apresentou maior abundância nos espermatozoides de touros de alta fertilidade. Da mesma forma, no segundo estudo este miRNA foi mais detectado nas amostras dos touros controle do que daqueles submetidos ao estresse térmico testicular conforme mostra a figura 25. A diminuição da abundância deste miRNA é associada com processos isquêmicos que levam a hipóxia em tumores, tendo potencial uso como molécula de diagnóstico nesses processos (GUENTHER; SCHREPFER, 2016). Em espermatozoides, esse miRNA ainda é pouco descrito.

Figura 25 - Médias e erro padrão da média do nível de abundância ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-126-5p em espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade em **A** e em espermatozoides de touros submetidos (grupo *heat stress*) ou não (grupo controle) ao estresse térmico testicular em **B** e do miR-146a em espermatozoides de touros submetidos ou não ao estresse térmico testicular em **C**

Fonte: Alves (2018).

Notas: #Indica diferença entre os grupos considerando $0,05 \leq P \leq 0,10$. *Indica diferença entre os grupos com $P \leq 0,05$.

Legenda: AF: alta fertilidade; BF: baixa fertilidade; CO: controle; HS: grupo *heat stress* induzido ao estresse térmico testicular

Assim como o miR-126-5p, o miR-146a apresentou maior abundância nos espermatozoides dos touros não submetidos ao estresse térmico testicular (Figura 25-C) e foi exclusivamente detectado nos espermatozoides dos touros de alta fertilidade do primeiro estudo. Corroborando os resultados, em células induzidas *in vitro* ao estresse oxidativo, há diminuição da abundância do miR-146a (CHELESCHI et al., 2017). Assim como o miR-126-5p, este miRNA é pouco descrito em espermatozoides. Porém, com base nos resultados obtidos e na literatura, podemos sugerir que os miR-126-5p e miR-146a apresentam importância na

fertilidade e são regulados por processos que interferem na espermatogênese envolvendo hipóxia e estresse oxidativo.

Dessa forma, tendo em vista os resultados obtidos dos dois estudos, podemos sugerir que os miRNAs miR-205, -532, -339a, -216b, -126-5p e -146a são miRNAs importantes para a fertilidade conforme ilustrado na figura 26. Dentre eles, os miR-205, -532, -126-5p e -146a favorecem a fertilidade, visto que a maior abundância deles é associada com amostras de alta fertilidade. Já os miR-339a e -216b desfavorecem a fertilidade quando estão muito abundantes. Ainda, mostramos que os miR-15a, -34b, -34c, -200b e -449a, assim como relatados em estudos anteriores, e os miR-126-5p e -146a, além de serem importantes para a fertilidade, são regulados pela espermatogênese, sendo que danos à espermatogênese prejudicam os níveis de abundância destes miRNAs e provavelmente levam a prejuízos à fertilidade. Por fim, mostramos que o miR-216b é entregue do espermatozoide ao embrião e alta abundância dele é associada com menores taxas de primeira clivagem e consequente prejuízo ao desenvolvimento embrionário inicial de bovinos, mas que este miRNA provavelmente não é influenciado por danos à espermatogênese.

Figura 26 – Esquema ilustrativo sobre a importância dos miRNAs descritos nos estudos desta tese sobre os processos reprodutivos de touros

Fonte: Alves (2018).

Com tudo isso podemos concluir que os miRNAs são moléculas importantes para os processos ligados à fertilidade e possuem potencial em serem utilizadas como moléculas

biomarcadoras para o diagnóstico do potencial fértil e também, futuramente, como métodos terapêuticos de casos de infertilidade. Entendemos que este estudo possui grande importância em mostrar a regulação dos miRNAs frente a impactos sobre a espermatogênese e, principalmente, mostrar que o espermatozoide é capaz de contribuir com miRNA espermático importante para o desenvolvimento embrionário inicial. Com esses conhecimentos gerados, esperamos iniciar uma nova linha de pesquisa sobre a importância desses fatores moleculares no espermatozoide e na fertilidade em bovinos.

REFERÊNCIAS

- AARABI, M.; BALAKIER, H.; BASHAR, S.; MOSKOVTSSEV, S. I.; SUTOVSKY, P.; LIBRACH, C. L.; OKO, R. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 2, p. 440–447, 2014.
- ABU-HALIMA, M.; BACKES, C.; LEIDINGER, P.; KELLER, A.; LUBBAD, A. M.; HAMMADEH, M.; MEESE, E. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 1, p. 78–86, 2014a.
- ABU-HALIMA, M.; HAMMADEH, M.; BACKES, C.; FISCHER, U.; LEIDINGER, P.; LUBBAD, A. M.; KELLER, A.; MEESE, E. A panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 4, p. 989–997, 2014b.
- ABU-HALIMA, M.; SC, M.; HAMMADEH, M.; SCHMITT, J.; SC, M.; LEIDINGER, P.; PH, D. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 5, p. 1249–1255, 2013.
- AGARWAL, A.; BERTOLLA, R. P.; SAMANTA, L. Sperm proteomics: potential impact on male infertility treatment. **Expert Review of Proteomics**, v. 13, n.3, p. 285–296, 2016.
- AGARWAL, A.; ESTEVES, S. Varicocele and male infertility: current concepts and future perspectives. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 161, 2016.
- AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors Affecting Seasonal Variation in 90-Day Nonreturn Rate To First Service in Lactating Holstein Cows in a Hot Climate. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2611–2616, 1999.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garranhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 204–209, 2009.
- ALVES, M. B. R.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; LANÇONI, R.; OLIVEIRA, B. M. M.; TORRES, M. A.; RAVAGNANI, G. M.; ALMEIDA, T. G.; VELLONE, V. S.; CELEGHINI, E. C. C. An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species: The CellRox Deep Red® Fluorescent Probe. **Biochemistry & Physiology: Open Access**, v. 4, n. 2, p. 1–5, 2015.
- ALVES, M. B. R.; ANDRADE, A. F. C. de; ARRUDA, R. P. de; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; OLIVEIRA, B. M. M. de; TORRES, M. A.; LANÇONI, R.;

- RAVAGNANI, G. M.; PRADO FILHO, R. R. do; VELLONE, V. S.; LOSANO, J. D. de A.; FRANCI, C. R.; NICHI, M.; CELEGHINI, E. C. C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 795–805, 2016a.
- ALVES, M. B. R.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; DE OLIVEIRA, B. M. M.; TORRES, M. A.; RAVAGNANI, G. M.; LANÇONI, R.; DE ALMEIDA, T. G.; STORILLO, V. M.; VELLONE, V. S.; FRANCI, C. R.; THOMÉ, H. E.; CANELLA, C. L.; DE ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C. Low-level laser therapy to recovery testicular degeneration in rams: effects on seminal characteristics, scrotal temperature, plasma testosterone concentration, and testes histopathology. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 4, p. 695–704, 2016b.
- ALVES, M. B. R.; ARRUDA, R. P.; DA SILVEIRA, J. C.; PERECIN, F. ; CELEGHINI, E. C. C. MicroRNAs: uma nova abordagem para a predição da fertilidade em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 46-53, 2017.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 397–406, 1993.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–355, 2004.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.
- ANDRADE, A. F. C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de eqüinos**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, 2011.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; CARLI, G. De; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. D. P. Morfologia espermática de touros : interpretação e impacto na fertilidad e. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 47–60, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). **Exportações de sêmen bovino devem dobrar nos próximos anos**. 2017. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/noticias/exportacoes-de-semen-bovino-devem-dobrar-nos-proximos-anos_370137.html> Acesso em: 28 ago. 2018.

BARCELÓ, M.; MATA, A.; BASSAS, L.; LARRIBA, S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. **Human Reproduction**, v. 33, n. 6, p. 1087–1098, 2018.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 20–51, 2018.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTIS, C. M.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. **Biotecnologia da reprodução em bovinos**, p. 113–132, 2006. Trabalho apresentado ao 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. a. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A. H. de; SÁ FILHO, M. F. de; MARQUES, M. O.; SALES, J. N. de S. Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): financial payback based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 247–255, 2018.

BAVISTER, D.; LORRAINE, M. Development of Preimplantation in a Defined Embryos of the Golden Culture Medium. **Biological Trace Element Research**, v. 28, p. 235–247, 1983.

BELLEANNÉE, C. 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.

BELLEANNÉE, C.; CALVO, É.; CABALLERO, J.; SULLIVAN, R. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 89, p. 30, 2013.

BENITO, E.; KERIMOGLU, C.; RAMACHANDRAN, B.; PENA-CENTENO, T.; JAIN, G.;

-
- STILLING, R. M.; ISLAM, M. R.; CAPECE, V.; ZHOU, Q.; EDBAUER, D.; DEAN, C.; FISCHER, A. RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after Environmental Enrichment. **Cell Reports**, v. 23, n. 2, p. 546–554, 2018.
- BETLACH, C.; ERICKSON, R. A unique RNA species from maturing mouse spermatozoa. **Nature**, v. 242, p. 114–115, 1973.
- BIANCHI, E.; DOE, B.; GOULDING, D.; WRIGHT, G. J. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. **Nature**, v. 508, p. 483–487, 2014.
- BJÖRKGREN, I.; SAASTAMOINEN, L.; KRUTSKIKH, A.; HUHTANIEMI, I.; POUTANEN, M.; SIPILÄ, P. Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–11, 2012.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinär Medicin**, v. 25, p. 383–391, 1973.
- BOERKE, A.; DIELEMAN, S. J.; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, n. 1, p. S147–55, 2007.
- BOUHALIER, F.; ALLIOLI, N.; LAVIAL, F.; CHALMEL, F.; PERRARD, M.-H.; DURAND, P.; SAMARUT, J.; PAIN, B.; ROUAULT, J.-P. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. **RNA**, v. 16, n. 4, p. 720–31, 2010.
- BRAUDE, P.; BOLTON, V.; MOORE, S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. **Nature**, v. 31, p. 459–461, 1988. .
- BRAUNDMEIER, A. G.; MILLER, D. J. The Search is on: Finding Accurate Molecular Markers of Male Fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 1915–1925, 2001.
- BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1–2, p. 139–44, 2002.
- BRISCOE, J.; THÉRON, P. P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 7, p. 418–431, 2013.
- BRITO, L. F. C. Variations in Laboratory Semen Evaluation Procedures and Testing. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 23., 2010, Milwaukee, WI. **Proceedings...** Milwaukee: NAAB, 2010. p.

61-67.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 1–15, 2003.

BUCKMAN, C.; OZANON, C.; QIU, J.; SUTOVSKY, M.; CARAFA, J. A.; RAWE, V. Y.; MANANDHAR, G.; MIRANDA-VIZUETE, A.; SUTOVSKY, P. Semen Levels of Spermatid-Specific Thioredoxin-3 Correlate with Pregnancy Rates in ART Couples. **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–13, 2013.

CAMARGO, L. S. de A.; FERREIRA DE SÁ, W.; DE MORAES FERREIRA, A.; MOREIRA VIANA, J. H.; COUTO ARAÚJO, M. C. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozoides na fecundação in vitro em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 709–715, 2002.

CAPRA, E.; TURRI, F.; LAZZARI, B.; CREMONESI, P.; GLIOZZI, T. M.; FOJADELLI, I.; STELLA, A.; PIZZI, F. Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High- and Low-motile sperm populations. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. De; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; SANTOS, F. B.; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M. de. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos Impact of semen quality on field fertility in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 40–45, 2017.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2–4, p. 119–131, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479–488, 2007.

CHELESCHI, S.; DE PALMA, A.; PASCARELLI, N. A.; GIORDANO, N.; GALEAZZI, M.; TENTI, S.; FIORAVANTI, A. Could oxidative stress regulate the expression of microRNA-146a and microRNA-34a in human osteoarthritic chondrocyte cultures? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2660, 2017.

CHEN, X.; CHE, D.; ZHANG, P.; LI, X.; YUN, Q.; LIU, T.; GUO, J.; FENG, T.; WU, L.; LIAO, M.; HE, Z.; ZENG, W. Profiling of miRNAs in porcine germ cells during

spermatogenesis. **Reproduction**, v. 154, n. 6, p. 789–798, 2017.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49 p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104 p.

CONINE, C. C.; SUN, F.; SONG, L.; RIVERA-PE, J. A.; RANDO, O. J. Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in mice. **Developmental Cell**, v. 46, p. 1–11, 2018.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 721–731, 1997.

CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, p. 561–563, 1970.

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.

D'AMOURS, O.; FRENETTE, G.; BORDELEAU, L.-J.; ALLARD, N.; LECLERC, P.; BLONDIN, P.; SULLIVAN, R. Epididymosomes transfer epididymal sperm binding protein 1 (ELSPBP1) to dead spermatozoa during epididymal transit in bovine. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1–11, 2012.

DA SILVEIRA, J.; DE ÁVILA, A. C. F. C. M.; GARRETT, H. L.; BRUEMMER, J. E.; WINGER, Q. A.; BOUMA, G. J. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. **Journal of Endocrinology**, v. 236, n. 1, p. R15–R27, 2018.

DAS, P. J.; MCCARTHY, F.; VISHNOI, M.; PARIA, N.; GRESHAM, C.; LI, G.; KACHROO, P.; SUDDERTH, A. K.; TEAGUE, S.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEPP, T. Stallion sperm transcriptome comprises functionally coherent coding and regulatory RNAs as revealed by microarray analysis and RNA-seq. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–15, 2013.

DAVID, I.; KOHNKE, P.; LAGRIFFOUL, G.; PRAUD, O.; PLOUARBOUÉ, F.; DEGOND, P.; DRUART, X. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 4–10, 2015.

DE BEM, T. H. C.; ADONA, P. R.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; CHIARATTI, M.

R.; MEIRELLES, F. V.; LEAL, C. L. V. The Influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and bax transcripts on the developmental competence of bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 4, p. 576–583, 2014.

DE BEM, T. H. C.; DA SILVEIRA, J. C.; SAMPAIO, R. V.; SANGALLI, J. R.; OLIVEIRA, M. L. F.; FERREIRA, R. M.; SILVA, L. A.; PERECIN, F.; KING, W. A.; MEIRELLES, F. V.; RAMOS, E. S. Low levels of exosomal-miRNAs in maternal blood are associated with early pregnancy loss in cloned cattle. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

DE KRETZER, D. M.; BAKER, H. W. G. Infertility in men: Recent advances and continuing controversies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 10, p. 3443–3450, 1999.

DE VRIES, M.; RAMOS, L.; HOUSEIN, Z.; DE BOER, P. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. **Biology Open**, v. 1, n. 5, p. 446–457, 2012.

DEL COLLADO, M. **Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária e o desenvolvimento in vivo e in vitro em bovinos**. 2017. 222 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

DEL COLLADO, M.; DA SILVEIRA, J. C.; OLIVEIRA, M. L. F.; ALVES, B. M. S. M.; SIMAS, R. C.; GODOY, A. T.; COELHO, M. B.; MARQUES, L. A.; CARRIERO, M. M.; NOGUEIRA, M. F. G.; EBERLIN, M. N.; SILVA, L. A.; MEIRELLES, F. V.; PERECIN, F. In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v. 154, n. 6, p. 881–893, 2017.

DENG, M.; TANG, H.; ZHOU, Y.; ZHOU, M.; XIONG, W.; ZHENG, Y.; YE, Q.; ZENG, X.; LIAO, Q.; GUO, X.; LI, X.; MA, J.; LI, G. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 17, p. 2997–3005, 2011.

DOMENICONI, R. F.; SOUZA, A. C. F.; XU, B.; WASHINGTON, A. M.; HINTON, B. T. Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 1, p. 1–8, 2016.

EVERS, J. L. H. Female subfertility. **Lancet**, v. 360, n. 9327, p. 151–159, 2002.

FAGERLIND, M.; STALHAMMAR, H.; OLSSON, B.; KLINGA-LEVAN, K. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 587–594, 2015.

FARRELL, P. B.; PRESICCE, G. a; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of

bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 98, p. 871–879, 1998.

FENG, R.; SANG, Q.; ZHU, Y.; FU, W.; LIU, M.; XU, Y.; SHI, H.; XU, Y.; QU, R.; CHAI, R.; SHAO, R.; JIN, L.; HE, L.; SUN, X.; WANG, L. MiRNA-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8689, 2015.

FERLIN, A.; RAICU, F.; GATTA, V.; ZUCCARELLO, D.; PALKA, G.; FORESTA, C. Male infertility: role of genetic background. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 14, n. 6, p. 734–745, 2007.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, p. 1560–1568, 2008.

FERNÁNDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. Ras in cancer and developmental diseases. **Genes and Cancer**, v. 2, n. 3, p. 344–358, 2011.

FERREIRA, R. M.; CONTI, T. L.; GONÇALVES, R. L.; SOUTO, L. A.; SALES, J. N. S.; SÁ FILHO, M. F.; ELLIFF, F. M.; BARUSELLI, P. S. Synchronization treatments previous to natural breeding anticipate and improve the pregnancy rate of postpartum primiparous beef cows. **Theriogenology**, v. 114, p. 206–211, 2018.

FEUGANG, J. M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G. C.; TOPPER, E. K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: Implications for male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 3, p. 312–324, 2010.

FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A. **Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade in vivo em bovinos**: contribuição dos marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas. 2017. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

FLOWERS, W. L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 67–78, 1997.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: A review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v. 75, n. 1–2, p. 119–139, 2003.

FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, a F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and

mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44, p. 154–159, 2012.

FRENETTE, G.; GIROUARD, J.; D'AMOURS, O.; ALLARD, N.; TESSIER, L.; SULLIVAN, R. Characterization of two distinct populations of epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 473–80, 2010.

FUKUDA, Y.; CHANG, M. C. Relationship between sperm concentration and polyspermy in intact and zona-free mouse eggs inseminated in vitro. **Archives of Andrology**, v. 1, n. 3, p. 267–273, 1978.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros simental**. 2004. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445–457, 2005.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3–4, p. 201–214, 2008.

GOVINDARAJU, A.; UZUN, A.; ROBERTSON, L.; ATLI, M. O.; KAYA, A.; TOPPER, E.; CRATE, E. a; PADBURY, J.; PERKINS, A.; MEMILI, E. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 82, p. 1–10, 2012.

GRAF, A.; KREBS, S.; HEININEN-BROWN, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; BLUM, H.; WOLF, E. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, p. 46–58, 2014a.

GRAF, A.; KREBS, S.; ZAKHARTCHENKO, V.; SCHWALB, B.; BLUM, H.; WOLF, E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 11, p. 4139–4144, 2014b.

GUENTHER, S. P. W.; SCHREPPFER, S. miR-126: a potential new key player in hypoxia and reperfusion? **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 19, p. 377–377, 2016.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.

HALL, J. L. Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. **Fertility and Sterility**, v. 35, p. 457–463, 1981.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341–3350, 2009.

HASSANIN, A. M.; AHMED, H. H.; KADDAH, A. N. A global view of the pathophysiology of varicocele. **Andrology**, p. 1–8, 2018.

HAYASHI, K.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; KANEDA, M.; TANG, F.; HAJKOVA, P.; LAO, K.; O'CARROLL, D.; DAS, P. P.; TARAKHOVSKY, A.; MISKA, E. A.; SURANI, M. A. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. **PLOS ONE**, v. 3, n. 3, p. 1–9, 2008.

HINTON, B. T.; GALDAMEZ, M. M.; SUTHERLAND, A.; BOMGARDNER, D.; XU, B.; ABDEL-FATTAH, R.; YANG, L. How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 558–64, 2011.

HU, L.; WU, C.; GUO, C.; LI, H.; XIONG, C. Identification of microRNAs predominately derived from testis and epididymis in human seminal plasma. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 10–11, p. 967–972, 2013.

INTASQUI, P.; CAMARGO, M.; ANTONIASSI, M. P.; CEDENHO, A. P.; CARVALHO, V. M.; CARDOZO, K. H. M.; ZYLBERSZTEJN, D. S.; BERTOLLA, R. P. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 3, p. 617–628, 2016.

IWASAKI, S.; KOBAYASHI, M.; YODA, M.; SAKAGUCHI, Y.; KATSUMA, S.; SUZUKI, T.; TOMARI, Y. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 292–299, 2010.

JAN, S. Z.; HAMER, G.; REPPING, S.; DE ROOIJ, D. G.; VAN PELT, A. M. M.; VORMER, T. L. Molecular control of rodent spermatogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1838–1850, 2012.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy ai bulls. **Theriogenology**, v. 53, p. 859–875, 2000.

JERCZYNSKI, O.; LACROIX-PÉPIN, N.; BOILARD, E.; CALVO, E.; BERNET, A.; FORTIER, M. A.; BJÖRKGREN, I.; SIPILÄ, P.; BELLEANNÉE, C. Role of Dicer1 -

Dependent Factors in the Paracrine Regulation of Epididymal Gene Expression. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0163876, 2016.

Ji, Z.; LU, R.; MOU, L.; DUAN, Y. G.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; GUI, Y.; CAI, Z. Expressions of miR-15a and its target gene HSPA1B in the spermatozoa of patients with varicocele. **Reproduction**, v. 147, n. 5, p. 693–701, 2014.

JODAR, M.; SELVARAJU, S.; SENDLER, E.; DIAMOND, M. P.; KRAWETZ, S. a. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 6, p. 604–624, 2013.

JOHNSON, L.; GREENBAUM, D.; CICHOWSKI, K.; MERCER, K.; MURPHY, E.; SCHMITT, E.; BRONSON, R. T.; UMANOFF, H.; EDELMANN, W.; KUCHERLAPATI, R.; JACKS, T. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. **Genes and Development**, v. 11, p. 2468–2481, 1997.

JOHNSON, R. S.; VAN LINGEN, B.; PAPAIOANNOU, V. E.; SPIEGELMAN, B. M. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. **Genes and Development**, v. 7, n. 7 B, p. 1309–1317, 1993.

JONES, R. E.; LOPEZ, K. H. Gamete Transport and Fertilization. In: JONES, R. E.; LOPEZ, K. **Human Reproductive Biology**. Cambridge: Academic Press, 2013. cap. 9, p.159-172.

JÚNIOR, J. S. O.; POTIENS, J. R.; ANDRADE, J. S.; MOREIRA, E. M.; NEVES, P. M. A.; SILVA, G. M.; AMORIM, R. L.; PFEIFER, L. F. M. Association between sperm hyperactivation and ovulatory capacity on fertility in timed AI postpartum cows. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 468, 2018.

KASHIR, J.; HEINDRYCKX, B.; JONES, C.; DE SUTTER, P.; PARRINGTON, J.; COWARD, K. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 6, p. 690–703, 2010.

KASIMANICKAM, V.; KASIMANICKAM, R.; ARANGASAMY, A.; SABERIVAND, A.; STEVENSON, J. S.; KASTELIC, J. P. Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 2007–2019, 2012.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 81–85, 1996.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; SAACKE, R. G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v.

45, p. 935–942, 1996.

KASTELIC, J. P.; WILDE, R. E.; RIZZOTO, G.; THUNDATHIL, J. C. Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. **Veterinarni Medicina**, v. 62, n. 8, p. 437–442, 2017.

KAWAMATA, T.; TOMARI, Y. Making RISC. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 7, p. 368–376, 2010.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 376–385, 2005.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 126–139, 2009.

KIM, V. N.; NAM, J. Genomics of microRNA. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 165–172, 2006.

KOERA, K.; NAKAMURA, K.; NAKAO, K.; MIYOSHI, J.; TOYOSHIMA, K.; HATTA, T.; OTANI, H.; AIBA, a; KATSUKI, M. K-ras is essential for the development of the mouse embryo. **Oncogene**, v. 15, n. 10, p. 1151–1159, 1997.

KONG, X.; YANG, S.; GONG, F.; LU, C.; ZHANG, S.; LU, G.; LIN, G. The relationship between cell number, division behavior and developmental potential of cleavage stage human embryos: A time-lapse study. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–11, 2016.

KOTAJA, N. MicroRNAs and spermatogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 6, p. 1552–1562, 2014.

KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; LAMB, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 4, p. 998–1007, 2013.

KRAWETZ, S. A. Paternal contribution: new insights and future challenges. **Nature Reviews. Genetics**, v. 6, n. 8, p. 633–642, 2005.

KRAWETZ, S. a.; KRUGER, A.; LALANCETTE, C.; TAGETT, R.; ANTON, E.; DRAGHICI, S.; DIAMOND, M. P. A survey of small RNAs in human sperm. **Human Reproduction**, v. 26, n. 12, p. 3401–3412, 2011.

KUMAR, G.; PATEL, D.; NAZ, R. K. c-MYC mRNA is present in human sperm cells.

Cellular and Molecular Biology Research, v. 39, n. 2, p. 111–117, 1993.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, p. 60–61, 2000.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LEE, R. T. H.; ZHAO, Z.; INGHAM, P. W. Hedgehog signalling. **Development**, v. 143, n. 3, p. 367–372, 2016.

LIU, S.; ZHANG, E.; YANG, M.; LU, L. Overexpression of Wnt11 promotes chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in synergism with TGF- β . **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 390, n. 1–2, p. 123–131, 2014.

LIU, W.; PANG, R. T. K.; CHIU, P. C. N.; WONG, B. P. C.; LAO, K.; LEE, K. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 2, p. 490–494, 2012.

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 781–810, 2004.

LUO, Z.; LIU, Y.; CHEN, L.; ELLIS, M.; LI, M.; WANG, J.; ZHANG, Y.; FU, P.; WANG, K.; LI, X.; WANG, L. microRNA profiling in three main stages during porcine spermatogenesis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, p. 451–460, 2015.

MANEELY, B. Epididymal structure and function : a historical and critical review. **Acta Zoologica**, p. 1–21, 1959.

MARQUES, M. de O.; MOROTTI, F.; LORENZETTI, E.; BIZARRO-SILVA, C.; SENEDA, M. M. Intensified use of TAI and sexed semen on commercial farms. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 197–203, 2018.

MATTICK, J. S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. **EMBO Reports**, v. 2, n. 11, p. 986–991, 2001.

MATTICK, J. S. Challenging the dogma: The hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **BioEssays**, v. 25, n. 10, p. 930–939, 2003.

MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N. L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 36–41, 1998.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Control of Gene Expression at the Onset of Bovine Embryonic Development. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 5, p. 1198–1207, 1999.

MESTDAGH, P.; VAN VLIERBERGHE, P.; DE WEER, A.; MUTH, D.; WESTERMANN, F.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. **Genome Biology**, v. 10, n. 6, p. R64.1-R64.10, 2009.

MILLER, D.; BRIGGS, D.; SNOWDEN, H.; HAMLINGTON, J.; ROLLINSON, S.; LILFORD, R.; KRAWETZ, S. A. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: Implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. **Gene**, v. 237, n. 2, p. 385–392, 1999.

MOR, G.; CARDENAS, I.; ABRAHAMS, V.; GULLER, S. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, n. 1, p. 80–87, 2011.

MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; TORRES, C. A. A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2–4, p. 148–154, 2010.

MOROSAN-PUOPOLO, G.; BALAKRISHNAN-RENUKA, A.; YUSUF, F.; CHEN, J.; DAI, F.; ZOIDL, G.; LÜDTKE, T. H. W.; KISPERS, A.; THEISS, C.; ABDELSABOUR-KHALAF, M.; BRAND-SABERI, B. Wnt11 is required for oriented migration of dermogenic progenitor cells from the dorsomedial lip of the avian dermomyotome. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. 92679, 2014.

MORRELL, J. M.; VALEANU, A. S.; LUNDEHEIM, N.; JOHANNISSON, A. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 41, p. 1–10, 2018.

MORTIMER, S. T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 3, p. 195–203, 1990.

MOSHER, W. D.; PRATT, W. F. Fecundity and infertility in the United States. **American Journal of Public Health**, v. 78, n. 2, p. 181–182, 1988.

MOULE, G. R.; WAITES, G. M. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 433–446, 1963.

MOURA, M. D. De; SOUZA, M. D. C. B. De; SCHEFFER, B. B. Reprodução assistida - um pouco de história. **Revista da Sociedade Brasileira de Psicologia Hospitalar**, v. 12, p. 23–42, 2009.

NAKAMURA, K.; ICHISE, H.; NAKAO, K.; HATTA, T.; OTANI, H.; SAKAGAMI, H.; KONDO, H.; KATSUKI, M. Partial functional overlap of the three ras genes in mouse embryonic development. **Oncogene**, v. 27, n. 21, p. 2961–2968, 2008.

NAVARRO, A.; MONZÓ, M. MicroRNAs in human embryonic and cancer stem cells. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, n. 5, p. 622–632, 2010.

NI, M. J.; HU, Z. H.; LIU, Q.; LIU, M. F.; LU, M. H.; ZHANG, J. S.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. L. Identification and characterization of a novel non-coding RNA involved in sperm maturation. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26053, 2011.

NIXON, B.; STANGER, S. J.; MIHALAS, B. P.; REILLY, J. N.; ANDERSON, a. L.; TYAGI, S.; HOLT, J. E.; MCLAUGHLIN, E. a. The MicroRNA Signature of Mouse Spermatozoa Is Substantially Modified During Epididymal Maturation. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 4, p. 91, 2015.

ODIA, M.; SWANSON, G.; KRAWETZ, S. A. A history of why fathers' RNA matters. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 1, p. 147–159, 2018.

OHTO, U.; ISHIDA, H.; KRAYUKHINA, E.; UCHIYAMA, S.; INOUE, N.; SHIMIZU, T. Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. **Nature**, v. 534, n. 7608, p. 566–569, 2016.

OLIVEIRA, B. M.; ARRUDA, R. P.; THOMÉ, H. E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, C.; NICHI, M.; SILVA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, p. 767–772, 2014.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P. De; ANDRADE, A. F. C. De; CELEGHINI, E. C. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P. N.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; MONTEIRO, F. M.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 3–4, p. 145–155, 2013.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; MARTINS, J. P. N.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws on conception rate to timed AI in suckled multiparous Nelore cows. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1800–1813, 2012a.

OLIVEIRA, L. Z.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; DOS SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; OLIVEIRA, C. S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v. 146, n. 1, p. 38–46, 2012b.

OLSZANSKA, B.; BORGUL, A. Quantitation of nanogram amounts of nucleic acids in the presence of proteins by the ethidium bromide staining technique. **Acta Biochimica Polonica**, v. 37, n. 1, p. 59–63, 1990.

OSTERMEIER, G. C.; DIX, D. J.; MILLER, D.; KHATRI, P.; KRAWETZ, S. A. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. **Lancet**, v. 360, n. 9335, p. 772–777, 2002.

OSTERMEIER, G. C.; GOODRICH, R. J.; DIAMOND, M. P.; DIX, D. J.; KRAWETZ, S. A. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 6, p. 1687–1694, 2005a.

OSTERMEIER, G. C.; GOODRICH, R. J.; MOLDENHAUER, J. S.; DIAMOND, M. P.; KRAWETZ, S. A. A suite of novel human spermatozoal RNAs. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 70–4, 2005b.

OSTERMEIER, G. C.; MILLER, D.; HUNTRISS, J. D.; DIAMOND, M. P.; KRAWETZ, S. A. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 154, 2004.

PAPAIIOANNOU, M. D.; PITETTI, J. L.; RO, S.; PARK, C.; AUBRY, F.; SCHAAD, O.; VEJNAR, C. E.; KÜHNE, F.; DESCOMBES, P.; ZDOBNOV, E. M.; MCMANUS, M. T.; GUILLOU, F.; HARFE, B. D.; YAN, W.; JÉGOU, B.; NEF, S. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. **Developmental Biology**, v. 326, n. 1, p. 250–259, 2009.

PASQUINELLI, A.E.; REINHART, B. J.; SLACK, F.; MARTINDALE, M. Q.; KURODA, M. I.; MALLER, B.; HAYWARD, D. C.; BALL, E. E.; DEGNAN, B.; MÜLLER, P.; SPRING, J.; SRINIVASAN, A.; FISHMAN, M.; FINNERTY, J.; CORBO, J.; LEVINE, M.; LEAHY, P.; DAVIDSON, E.; RUVKUN, G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86–89, 2000.

PAUL, C.; MURRAY, A. A.; SPEARS, N.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**, v. 136, p. 73–84, 2008.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A Single , Mild , Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death 1. **Biology of Reproduction**, v. 919, p. 913–919, 2009.

PAUL, J.; DUERKSEN, J. D. Chromatin-associated RNA content of heterochromatin and euchromatin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 9, n. 1, p. 9–16, 1975.

PERECIN, F.; MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; GARCIA, J. M. Oocyte activation and preimplantation development of bovine embryos obtained by specific inhibition of cyclin-dependent kinases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 280–287, 2007.

PESSOT, C. A.; BRITO, M.; FIGUEROA, J.; CONCHA, I. I.; YAÑEZ, A.; BURZIO, L. O. Presence of RNA in the sperm nucleus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, n. 1, p. 272–278, 1989.

PLANTE, L.; L. SHEPHERD, D.; ALLAN KING, W.; PLANTE, C. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. **Molecular Reproduction and Development**, v. 3, p. 375–383, 1994.

PUGLIESI, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA; MAIO, J. R. G.; BINELLI, M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1239–1248, 2016.

RAN, M.; WENG, B.; CAO, R.; LI, Z.; PENG, F.; LUO, H.; GAO, H.; CHEN, B. miR-26a inhibits proliferation and promotes apoptosis in porcine immature Sertoli cells by targeting the *PAK2* gene. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1–11, 2018.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

REILLY, J. N.; MCLAUGHLIN, E. A.; STANGER, S. J.; ANDERSON, A. L.; HUTCHEON, K.; CHURCH, K.; MIHALAS, B. P.; TYAGI, S.; HOLT, J. E.; EAMENS, A. L.; NIXON, B. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. **Scientific Reports**, v. 6, n. 31764, p. 1–15, 2016.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A.E.; BETTINGER, J. C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 2000.

RODGERS, A. B.; MORGAN, C. P.; LEU, N. A.; BALE, T. L. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 44, p. 13699–13704, 2015.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. D. S. C.; ESPER, C. R.; BARNABE, V. H.; FRANCESCHINI, P. H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes.

Animal Reproduction Science, v. 91, n. 1–2, p. 77–87, 2006.

RUWANPURA, S. M.; MCLACHLAN, R. I.; MEACHEM, S. J. Hormonal regulation of male germ cell development. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 2, p. 117–131, 2010.

SAACKE, R. G.; DALTON, J. C.; NADIR, S.; NEBEL, R. L.; BAME, J. H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 663–677, 2000.

SAACKE, R. G.; NADIR, S.; NEBEL, R. L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 45–50, 1994.

SAEZ, F.; FRENETTE, G. Epididymosomes and Prostatosomes : Their Roles in Posttesticular Maturation of the Sperm Cells. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 2, p. 149–154, 2003.

SAKURAI, K.; MIKAMOTO, K.; SHIRAI, M.; IGUCHI, T.; ITO, K.; TAKASAKI, W.; MORI, K. MicroRNA profiles in a monkey testicular injury model induced by testicular hyperthermia. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 12, p. 1614–1621, 2016.

SALAS-HUETOS, A.; BLANCO, J.; VIDAL, F.; GROSSMANN, M.; PONS, M. C.; GARRIDO, N.; ANTON, E. Sperm from normozoospermic fertile and infertile individuals convey a distinct miRNA cargo. **Andrology**, v. 4, n. 6, p. 1–9, 2016.

SAMANS, B.; YANG, Y.; KREBS, S.; SARODE, G. V.; BLUM, H.; REICHENBACH, M.; WOLF, E.; STEGER, K.; DANSRANJAVIN, T.; SCHAGDARSURENGIN, U. Uniformity of nucleosome preservation pattern in mammalian sperm and Its connection to repetitive DNA elements. **Developmental Cell**, v. 30, n. 1, p. 23–35, 2014.

SANCHEZ-SORIA, P.; CAMENISCH, T. D. ErbB signaling in cardiac development and disease. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 9, p. 929–935, 2010.

SANTOS, F. B. **Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após iatf em vacas de corte**. 2016. 62 f. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

SAUNDERS, C. M.; LARMAN, M. G.; PARRINGTON, J.; COX, L. J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L. M.; SWANN, K.; LAI, F. A. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. **Development**, v. 129, p. 3533–3544, 2002.

SCHATTEN, H.; SUN, Q.-Y. The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 9, p. 531–538, 2009.

SCHATTEN, H.; SUN, Q.-Y. New insights into the role of centrosomes in mammalian fertilization and implications for ART. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 793–801, 2011.

SEIDEL, G. E. Several insights on evaluation of semen. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 329–332, 2012.

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. C. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1447–1454, 2015.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: An Overview. **Sperm Chromatin**. New York: Springer, 2011, 512 p.

SHARMA, U.; CONINE, C. C.; SHEA, J. M.; BOSKOVIC, a.; DERR, a. G.; BING, X. Y.; BELLEANNEE, C.; KUCUKURAL, a.; SERRA, R. W.; SUN, F.; SONG, L.; CARONE, B. R.; RICCI, E. P.; LI, X. Z.; FAUQUIER, L.; MOORE, M. J.; SULLIVAN, R.; MELLO, C. C.; GARBER, M.; RANDO, O. J. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 391–396, 2016.

SHARMA, U.; SUN, F.; CONINE, C. C.; HERZOG, V. A.; AMERES, S. L.; RANDO, O. J.; SHARMA, U.; SUN, F.; CONINE, C. C.; REICHHOLF, B.; KUKREJA, S.; HERZOG, V. A. Small RNAs are trafficked from the epididymis to developing mammalian sperm. **Developmental Cell**, v. 46, p. 1–14, 2018.

SHEN, J.; XIA, W.; KHOTSKAYA, Y. B.; HUO, L.; NAKANISHI, K.; LIM, S. O.; DU, Y.; WANG, Y.; CHANG, W. C.; CHEN, C. H.; HSU, J. L.; WU, Y.; LAM, Y. C.; JAMES, B. P.; LIU, X.; LIU, C. G.; PATEL, D. J.; HUNG, M. C. EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. **Nature**, v. 497, n. 7449, p. 383–387, 2013.

SIMERLY, C.; WU, G. J.; ZORAN, S.; ORD, T.; RAWLINS, R.; JONES, J.; NAVARA, C.; GERRITY, M.; RINEHART, J.; BINOR, Z.; ASCH, R.; SCHATTEN, G. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for fertility. **Nature Medicine**, v. 1, n. 1, p. 47–52, 1995.

SINGH, R.; SENGAR, G. S.; SINGH, U.; DEB, R.; JUNGHARE, V.; HAZRA, S.; KUMAR, S.; TYAGI, S.; DAS, A. K.; RAJA, T. V.; KUMAR, A. Functional proteomic analysis of crossbred (Holstein Friesian × Sahiwal) bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 588–608, 2018.

SIRARD, M. A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 148–155, 2012.

- SMORAG, L.; ZHENG, Y.; NOLTE, J.; ZECHNER, U.; ENGEL, W.; PANTAKANI, D. V. K. MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: Evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation. **Biology of the Cell**, v. 104, n. 11, p. 677–692, 2012.
- SOFIKITIS, N.; GIOTITSAS, N.; TSOUNAPI, P.; BALTOGIANNIS, D.; GIANNAKIS, D.; PARDALIDIS, N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, n. 3–5, p. 323–330, 2008.
- SONG, R.; RO, S.; MICHAELS, J. D.; PARK, C.; MCCARREY, J. R.; BIOLOGY, C.; ANTONIO, S. Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. **Nature Genetics**, v. 41, n. 4, p. 488–493, 2009.
- SOOD, P.; KREK, A.; ZAVOLAN, M.; MACINO, G.; RAJEWSKY, N. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2746–2751, 2006.
- SPONCHIADO, M.; GOMES, N. S.; FONTES, P. K.; MARTINS, T.; DEL COLLADO, M.; PASTORE, A. D. A.; PUGLIESI, G.; NOGUEIRA, M. F. G.; BINELLI, M. Pre-hatching embryo-dependent and -independent programming of endometrial function in cattle. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–23, 2017.
- STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. **Animal**, v. 12, n. 1, p. s27–s35, 2018.
- STEGER, K.; WILHELM, J.; KONRAD, L.; STALF, T.; GREB, R.; DIEMER, T.; KLIESCH, S.; BERGMANN, M.; WEIDNER, W. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. **Human Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 11–16, 2008.
- SULLIVAN, R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 726–729, 2015.
- SULLIVAN, R.; FRENETTE, G.; GIROUARD, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 483–491, 2007.
- SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: Their roles in mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. R21–R35, 2013.
- SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm

maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2005.

SUTOVSKY, P.; AARABI, M.; MIRANDA-VIZUETE, A.; OKO, R. Negative biomarker based male fertility evaluation: Sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 554, 2015.

SUTOVSKY, P.; HAUSERS, R.; SUTOVSKY, M. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from a andrology laboratory clinic population. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 628–638, 2004.

SUTOVSKY, P.; TERADA, Y.; SCHATTEN, G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. **Human Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 250–258, 2001.

TANG, F.; KANEDA, M.; O'CARROLL, D.; HAJKOVA, P.; BARTON, S. C.; SUN, Y. A.; LEE, C.; TARAKHOVSKY, A.; LAO, K.; SURANI, M. A. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes and Development**, v. 21, n. 6, p. 644–648, 2007.

TARRAGÓ, O. F. B. **Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF?** 2017. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245–1252, 2004.

TSCHERNER, A.; GILCHRIST, G.; SMITH, N.; BLONDIN, P.; GILLIS, D.; LAMARRE, J. MicroRNA-34 family expression in bovine gametes and preimplantation embryos. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 85, 2014.

VALE FILHO, V. R.; MEGALE, F.; GARCIA, O. S.; ABREU, J. J.; FONSECA, V. O.; RESENDE, J. Prevalência das causas de baixa fertilidade e infertilidade, em touros criados em diferentes regiões do Brasil. De um levantamento de 9 Estados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SBMV, 1974. p. 179.

VINCENT, P.; UNDERWOOD, S. L.; DOLBEC, C.; BOUCHARD, N.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 153–165, 2012.

VISCONTI, P. E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 106, n. 3, p. 667–678, 2009.

VISCONTI, P. E.; KRAPP, D.; DE LA VEGA-BELTRÁN, J. L.; ACEVEDO, J. J.; DARSZON, A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 395–405, 2011.

VON, L.; NEUHAEUSER, G. Morphometric analysis of the human epididymis. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 124, p. 126–152, 1964.

WANG, C.; YANG, C.; CHEN, X.; YAO, B.; YANG, C.; ZHU, C.; LI, L.; WANG, J.; LI, X.; SHAO, Y.; LIU, Y.; JI, J.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C.-Y.; ZHANG, C. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 1722–1731, 2011.

WANG, L.; XU, C. Role of microRNAs in mammalian spermatogenesis and testicular germ cell tumors. **Reproduction**, v. 149, p. R127–R137, 2014.

WANG, M.; GAO, Y.; QU, P.; QING, S.; QIAO, F.; ZHANG, Y.; MAGER, J.; WANG, Y. Sperm-borne miR-449b influences cleavage, epigenetic reprogramming and apoptosis of SCNT embryos in bovine. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WANG, X.; ZHANG, P.; LI, L.; CHE, D.; LI, T.; LI, H.; LI, Q.; JIA, H.; TAO, S.; HUA, J.; ZENG, W.; LIAO, M. miRNA editing landscape reveals miR-34c regulated spermatogenesis through structure and target change in pig and mouse. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 4, p. 486–492, 2018.

WEINHOLD, B. Epigenetics: the science of change. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 3, p. 160–167, 2006.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, p. 855–862, 1993.

WYDOOGHE, E.; VANDAELE, L.; HERAS, S.; DE SUTTER, P.; DEFORCE, D.; PEELMAN, L.; DE SCHAUWER, C.; VAN SOOM, A. Autocrine embryotropins revisited: how do embryos communicate with each other in vitro when cultured in groups? **Biological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 505–520, 2017.

YADAV, R. P.; KOTAJA, N. Small RNAs in spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 498–508, 2014.

YU, C.; ZHANG, X.; WANG, L.; LIU, Y.; LI, N.; LI, M.; CHEN, L.; LIU, Y.; YAO, Y.

Interleukin-6 regulates expression of Fos and Jun genes to affect the development of mouse preimplantation embryos. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 44, n. 2, p. 253–262, 2018.

YU, J. S. L.; CUI, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. **Development**, v. 143, n. 17, p. 3050–3060, 2016.

YUAN, S.; SCHUSTER, A.; TANG, C.; YU, T.; ORTOGERO, N.; BAO, J.; ZHENG, H.; YAN, W. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. **Development**, v. 143, p. 635–647, 2016.

YUE, Z.; JIN, S.; YANG, C.; LEVINE, A. J.; HEINTZ, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 15077–15082, 2003.

ZANATTA, G. M.; ELLIFF, F. M.; MINGOTI, R. D.; SANTOS, F. B.; PENTEADO, L.; FILHO, M. F. S.; BARUSELLI, P. S. Effect of the delay at TAI in Nelore cows (*Bos indicus*) using low fertility bulls semen. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 660, 2017.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; ADAMSON, G. D.; DYER, S.; RACOWSKY, C.; DE MOUZON, J.; SOKOL, R.; RIENZI, L.; SUNDE, A.; SCHMIDT, L.; COOKE, I. D.; SIMPSON, J. L.; VAN DER POEL, S. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. **Fertility and Sterility**, v. 32, n. 9, p. 1786–1801, 2017.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HA, M. G. H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 253–260, 1999.

ZHANG, S.; ZHANG, Y.; YANG, C.; ZHANG, W.; JU, Z.; WANG, X.; JIANG, Q.; SUN, Y.; HUANG, J.; ZHONG, J.; WANG, C. TNP1 Functional SNPs in bta-miR-532 and bta-miR-204 Target Sites Are Associated with Semen Quality Traits in Chinese Holstein Bulls. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 139, p. 1–10, 2015.

ZIYYAT, A.; LEFÈVRE, A. Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 16, n. 7, p. 1449–1456, 2001.

APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO DE LITERATURA PUBLICADO

Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 46-53, jan./mar. 2017. Disponível em www.cbra.org.br

MicroRNAs: uma nova abordagem para a predição da fertilidade em touros

MicroRNAs: a new approach to predict fertility in bulls

Maira Bianchi Rodrigues Alves^{1,4}, Rubens Paes de Arruda², Juliano Coelho da Silveira³, Felipe Pereira³,
Eniciva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Laboratório de Pesquisa e Ensino em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

²Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

³Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

⁴maira.bianchi.alves@usp.br

Resumo

Atualmente, a predição da fertilidade masculina é realizada avaliando diversos aspectos morfofuncionais (MFF) espermáticos. Em geral, estas características MFF possuem alta correlação com a fertilidade. No entanto, existem ejaculados que embora possuam características MFF consideradas adequadas apresentam fertilidade insatisfatória. Assim, há demanda pela busca de novos marcadores que consigam prever a fertilidade dessas amostras seminais. Dentre estes, estão os microRNAs (miRNAs), reguladores pós-transcricionais, que desempenham funções importantes na espermatogênese, na maturação espermática e no desenvolvimento embrionário. Estudos com humanos e bovinos têm mostrado que essas moléculas possuem relação com a fertilidade. Além disso, já foi descrito também que os miRNAs são altamente regulados no sistema reprodutivo masculino, e principalmente, ao longo da cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Atualmente existem mais de 790 sequências maduras de miRNAs conhecidas em bovinos e o estabelecimento destes como marcadores se torna cada vez mais real. Entretanto, o grande desafio destes estudos está em mostrar como estes miRNAs efetivamente regulam a fertilidade e qual o papel deles nas funções espermáticas e no desenvolvimento embrionário. Desta forma, o objetivo desta revisão é compilar os dados existentes na literatura sobre os miRNAs e a fertilidade masculina.

Palavras-chave: espermatozoides, miRNAs, RNAs, bovinos, fertilidade.

Abstract

Fertility prediction is performed evaluating several sperm morphological and functional aspects (MFF). In general, MFF features present high correlation with fertility. However, there are ejaculates that, although present normal MFF features, have poor fertility results. So, there is necessity to investigate potential fertility molecular markers which are able to predict fertility rates. Among them are the microRNAs (miRNAs), which are post-transcriptional regulators molecules that are important to spermatogenesis, sperm maturation and also embryo development. Besides, miRNAs are related with men and bull fertility and are highly regulated on masculine tract. Currently, there are around 790 mature miRNA sequences in bovine, which could be used as biomarkers. Nevertheless, the big challenge is to show how miRNAs regulate fertility and their functions on sperm and embryo development. Thus, the goal of this review is to compile the data of scientific literature about miRNAs and male fertility.

Keywords: sperm, miRNAs, RNAs, bovine, fertility.

Introdução

A avaliação de diversas características morfofuncionais espermáticas relaciona-se com a fertilidade (Farrell et al., 1998; Gillan et al., 2008). Entretanto, até o momento, não foi encontrada uma técnica laboratorial isolada ou um marcador molecular eficiente em assegurar a fertilidade da amostra seminal (Brandmeier et al., 2001; Arruda et al., 2011). Assim a ideia proposta por Amann e Hammerstedt (1993) de que quanto mais características morfofuncionais forem avaliadas, mais preciso será o diagnóstico do potencial fértil da amostra seminal, é a mais aceita e efetuada atualmente para a predição da fertilidade.

No entanto, a realização de diversas técnicas laboratoriais muitas vezes é dificultada pelo custo, execução técnica e pelo tempo demandado. Além disso, as técnicas morfofuncionais podem ser subjetivas e variarem em função das diferentes técnicas existentes (Brito, 2010). Ademais, por observações na rotina do nosso laboratório sabe-se que existem amostras de sêmen que mesmo possuindo características morfofuncionais satisfatórias, possuem fertilidade menor que a média (dados não publicados). Assim, outros fatores podem estar envolvidos na determinação do potencial de fertilidade.

Recebido: 24 de março de 2017

Aceito: 10 de abril de 2017

APÊNDICE B – PREPARAÇÃO DO MINI-GRADIENTE DE PERCOLL®

A preparação do mini-gradiente de Percoll® foi feita inicialmente preparando o Percoll 90% (Percoll® suplementado com solução 10x¹, 1 M de cloreto de cálcio, 100 mM de cloreto de magnésio, 26,4 mM de ácido láctico e 20 mM de bicarbonato de sódio). O Percoll 45% foi feito diluindo 1:1 o Percoll 90% em meio TL-sêmen (estoque de Tyrode's-lactato suplementado com 2,38 mg/mL de Hepes, 50 µg/mL de gentamicina e 22 µg/mL de piruvato de sódio). O preparo do mini-gradiente foi feito e o sêmen foi adicionado. O mini-gradiente foi submetido à centrifugação por 7 minutos a 3.600g. Ao final, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de TL-sêmen. A solução foi submetida a nova centrifugação por 5 minutos a 520g. Ao final, foi retirado o sobrenadante e o pellet de espermatozoides foi diluído em meio FIV (meio estoque de Tyrode's-lactato suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 40 µl/mL de PHE [2 mM de D-penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 245 µM de epinefrina], 5,5 UI/mL de heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina [BSA]) de modo que a concentração final na gota de FIV fosse de 1.10^6 espermatozoides móveis/mL.

APÊNDICE C – RELAÇÃO DOS 380 MIRNAS INVESTIGADOS NAS PARTIDAS SELECIONADAS DE CADA TOURO

#	MiRNA	#	miRNA	#	miRNA	#	miRNA	#	miRNA
1	bta-let-7a-3p	77	bta-miR-142-5p	153	bta-miR-216a	229	bta-miR-361	305	bta-miR-496
2	bta-let-7a-5p	78	bta-miR-143	154	bta-miR-216b	230	bta-miR-362-3p	306	bta-miR-497
3	bta-let-7b	79	bta-miR-144	155	bta-miR-217	231	bta-miR-362-5p	307	bta-miR-499
4	bta-let-7c	80	bta-miR-145	156	bta-miR-218	232	bta-miR-363	308	bta-miR-500
5	bta-let-7d	81	bta-miR-146a	157	bta-miR-219	233	bta-miR-365-3p	309	bta-miR-502a
6	bta-let-7e	82	bta-miR-146b	158	bta-miR-219-3p	234	bta-miR-365-5p	310	bta-miR-502b
7	bta-let-7f	83	bta-miR-147	159	bta-miR-219-5p	235	bta-miR-367	311	bta-miR-503-3p
8	bta-let-7g	84	bta-miR-148a	160	bta-miR-221	236	bta-miR-369-3p	312	bta-miR-503-5p
9	bta-let-7i	85	bta-miR-148b	161	bta-miR-222	237	bta-miR-369-5p	313	bta-miR-504
10	bta-miR-1	86	bta-miR-149-3p	162	bta-miR-223	238	bta-miR-370	314	bta-miR-505
11	bta-miR-100	87	bta-miR-149-5p	163	bta-miR-22-3p	239	bta-miR-371	315	bta-miR-532
12	bta-miR-101	88	bta-miR-150	164	bta-miR-224	240	bta-miR-374a	316	bta-miR-539
13	bta-miR-103	89	bta-miR-151-3p	165	bta-miR-22-5p	241	bta-miR-374b	317	bta-miR-541
14	bta-miR-105a	90	bta-miR-151-5p	166	bta-miR-23a	242	bta-miR-375	318	bta-miR-542-5p
15	bta-miR-105b	91	bta-miR-152	167	bta-miR-23b-3p	243	bta-miR-376a	319	bta-miR-543
16	bta-miR-106a	92	bta-miR-153	168	bta-miR-23b-5p	244	bta-miR-376b	320	bta-miR-544a
17	bta-miR-106b	93	bta-miR-154a	169	bta-miR-24	245	bta-miR-376c	321	bta-miR-544b
18	bta-miR-107	94	bta-miR-154b	170	bta-miR-24-3p	246	bta-miR-376d	322	bta-miR-545-3p
19	bta-miR-10a	95	bta-miR-154c	171	bta-miR-25	247	bta-miR-376e	323	bta-miR-545-5p
20	bta-miR-10b	96	bta-miR-155	172	bta-miR-26a	248	bta-miR-377	324	bta-miR-551a
21	bta-miR-1179	97	bta-miR-15a	173	bta-miR-26b	249	bta-miR-378	325	bta-miR-551b
22	bta-miR-1185	98	bta-miR-15b	174	bta-miR-26c	250	bta-miR-378b	326	bta-miR-562
23	bta-miR-1193	99	bta-miR-16a	175	bta-miR-27a-3p	251	bta-miR-378c	327	bta-miR-568
24	bta-miR-1197	100	bta-miR-16b	176	bta-miR-27a-5p	252	bta-miR-378d	328	bta-miR-574
25	bta-miR-122	101	bta-miR-17-3p	177	bta-miR-27b	253	bta-miR-379	329	bta-miR-582

26	bta-miR-122	102	bta-miR-17-5p	178	bta-miR-28	254	bta-miR-380-3p	330	bta-miR-584
27	bta-miR-1224	103	bta-miR-181a	179	bta-miR-296-3p	255	bta-miR-380-5p	331	bta-miR-592
28	bta-miR-1225-3p	104	bta-miR-181b	180	bta-miR-296-5p	256	bta-miR-381	332	bta-miR-599
29	bta-miR-1246	105	bta-miR-181c	181	bta-miR-299	257	bta-miR-382	333	bta-miR-615
30	bta-miR-1247-3p	106	bta-miR-181d	182	bta-miR-29a	258	bta-miR-383	334	bta-miR-628
31	bta-miR-1247-5p	107	bta-miR-182	183	bta-miR-29b	259	bta-miR-409a	335	bta-miR-631
32	bta-miR-1248	108	bta-miR-183	184	bta-miR-29c	260	bta-miR-409b	336	bta-miR-652
33	bta-miR-1249	109	bta-miR-184	185	bta-miR-29d-3p	261	bta-miR-410	337	bta-miR-653
34	bta-miR-124a	110	bta-miR-185	186	bta-miR-29d-5p	262	bta-miR-411a	338	bta-miR-654
35	bta-miR-124b	111	bta-miR-186	187	bta-miR-29e	263	bta-miR-411b	339	bta-miR-655
36	bta-miR-125a	112	bta-miR-187	188	bta-miR-301a	264	bta-miR-411c-3p	340	bta-miR-656
37	bta-miR-125b	113	bta-miR-188	189	bta-miR-301b	265	bta-miR-411c-5p	341	bta-miR-658
38	bta-miR-1260b	114	bta-miR-18a	190	bta-miR-302a	266	bta-miR-412	342	bta-miR-660
39	bta-miR-126-3p	115	bta-miR-18b	191	bta-miR-302b	267	bta-miR-421	343	bta-miR-664a
40	bta-miR-126-5p	116	bta-miR-190a	192	bta-miR-302c	268	bta-miR-423-3p	344	bta-miR-664b
41	bta-miR-127	117	bta-miR-190b	193	bta-miR-302d	269	bta-miR-423-5p	345	bta-miR-665
42	bta-miR-1271	118	bta-miR-191	194	bta-miR-3064	270	bta-miR-424-3p	346	bta-miR-669
43	bta-miR-1277	119	bta-miR-192	195	bta-miR-30a-5p	271	bta-miR-424-5p	347	bta-miR-670
44	bta-miR-128	120	bta-miR-193a	196	bta-miR-30b-3p	272	bta-miR-425-3p	348	bta-miR-671
45	bta-miR-1281	121	bta-miR-193a-3p	197	bta-miR-30b-5p	273	bta-miR-425-5p	349	bta-miR-677
46	bta-miR-1282	122	bta-miR-193a-5p	198	bta-miR-30c	274	bta-miR-429	350	bta-miR-7
47	bta-miR-1284	123	bta-miR-193b	199	bta-miR-30d	275	bta-miR-431	351	bta-miR-708
48	bta-miR-1287	124	bta-miR-194	200	bta-miR-30e-5p	276	bta-miR-432	352	bta-miR-744
49	bta-miR-129	125	bta-miR-195	201	bta-miR-30f	277	bta-miR-433	353	bta-miR-758
50	bta-miR-1291	126	bta-miR-196a	202	bta-miR-31	278	bta-miR-448	354	bta-miR-759
51	bta-miR-129-3p	127	bta-miR-196b	203	bta-miR-32	279	bta-miR-449a	355	bta-miR-760-3p
52	bta-miR-129-5p	128	bta-miR-197	204	bta-miR-320a	280	bta-miR-449b	356	bta-miR-760-5p
53	bta-miR-1296	129	bta-miR-199a-3p	205	bta-miR-320b	281	bta-miR-449c	357	bta-miR-761

54	bta-miR-1298	130	bta-miR-199a-5p	206	bta-miR-323	282	bta-miR-449d	358	bta-miR-763
55	bta-miR-1301	131	bta-miR-199b	207	bta-miR-324	283	bta-miR-450a	359	bta-miR-764
56	bta-miR-1306	132	bta-miR-199c	208	bta-miR-326	284	bta-miR-450b	360	bta-miR-767
57	bta-miR-1307	133	bta-miR-19a	209	bta-miR-328	285	bta-miR-451	361	bta-miR-769
58	bta-miR-130a	134	bta-miR-19b	210	bta-miR-329a	286	bta-miR-452	362	bta-miR-873
59	bta-miR-130b	135	bta-miR-200a	211	bta-miR-329b	287	bta-miR-4523	363	bta-miR-874
60	bta-miR-132	136	bta-miR-200b	212	bta-miR-330	288	bta-miR-453	364	bta-miR-875
61	bta-miR-133a	137	bta-miR-200c	213	bta-miR-331-3p	289	bta-miR-454	365	bta-miR-876
62	bta-miR-133b	138	bta-miR-202	214	bta-miR-331-5p	290	bta-miR-455-3p	366	bta-miR-877
63	bta-miR-133c	139	bta-miR-204	215	bta-miR-335	291	bta-miR-455-5p	367	bta-miR-885
64	bta-miR-134	140	bta-miR-205	216	bta-miR-338	292	bta-miR-483	368	bta-miR-92a
65	bta-miR-1343-3p	141	bta-miR-206	217	bta-miR-339a	293	bta-miR-484	369	bta-miR-92b
66	bta-miR-1343-5p	142	bta-miR-208a	218	bta-miR-339b	294	bta-miR-485	370	bta-miR-93
67	bta-miR-135a	143	bta-miR-208b	219	bta-miR-33a	295	bta-miR-486	371	bta-miR-935
68	bta-miR-135b	144	bta-miR-20a	220	bta-miR-33b	296	bta-miR-487a	372	bta-miR-9-3p
69	bta-miR-136	145	bta-miR-20b	221	bta-miR-340	297	bta-miR-487b	373	bta-miR-940
70	bta-miR-137	146	bta-miR-210	222	bta-miR-342	298	bta-miR-488	374	bta-miR-95
71	bta-miR-138	147	bta-miR-211	223	bta-miR-345-3p	299	bta-miR-489	375	bta-miR-9-5p
72	bta-miR-1388-3p	148	bta-miR-212	224	bta-miR-345-5p	300	bta-miR-490	376	bta-miR-96
73	bta-miR-139	149	bta-miR-21-3p	225	bta-miR-346	301	bta-miR-491	377	bta-miR-98
74	bta-miR-140	150	bta-miR-214	226	bta-miR-34a	302	bta-miR-493	378	bta-miR-99a-3p
75	bta-miR-141	151	bta-miR-215	227	bta-miR-34b	303	bta-miR-494	379	bta-miR-99a-5p
76	bta-miR-142-3p	152	bta-miR-21-5p	228	bta-miR-34c	304	bta-miR-495	380	bta-miR-99b

Fonte: Alves (2018).

APÊNDICE D – RELAÇÃO DO NOVO PERFIL DE MIRNAS (19 MIRNAS ALVO + 3 NORMALIZADORES) INVESTIGADOS EM ESPERMATOZOIDES DE OUTRAS PARTIDAS DE SÊMEN E EM EMBRIÕES BOVINOS

#	miRNA	#	miRNA
1	bta-let-7b	12	bta-miR-339a
2	bta-miR-33b	13	bta-miR-425-3p
3	bta-miR-126-5p	14	bta-miR-500
4	bta-miR-137	15	bta-miR-505
5	bta-miR-146a	16	bta-miR-532
6	bta-miR-146b	17	bta-miR-542-5p
7	bta-miR-147	18	bta-miR-874
8	bta-miR-148a	19	bta-miR-1225-3p
9	bta-miR-195	20	bta-miR-99b
10	bta-miR-205	21	bta-miR-425-5p
11	bta-miR-216b	22	RNT43

Fonte: Alves (2018).

APÊNDICE E – TABELAS COM DADOS DAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS CONVENCIONAIS E FUNCIONAIS DE CADA PARTIDA DOS TOUROS UTILIZADOS NO CAPÍTULO 2

Tabela 19 – Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro BF-1

Características espermáticas morfofuncionais	Partidas			Valor de P
	BF-1-1	BF-1-2	BF-1-3	
Total de espermatozoides por palheta ($\times 10^6$)	21,87 $\pm$ 1,87	27,50 $\pm$ 5,62	23,75 $\pm$ 3,12	0,62
Total de espermatozoides móveis por palheta ($\times 10^6$)	11,94 $\pm$ 0,06	16,78 $\pm$ 4,75	13,89 $\pm$ 3,58	0,64
Motilidade subjetiva (%)	55,00 $\pm$ 5,00	60,00 $\pm$ 5,00	57,50 $\pm$ 7,50	0,84
Vigor (1-5)	3,50 $\pm$ 0,00	3,25 $\pm$ 0,25	3,25 $\pm$ 0,25	0,64
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	87,50 $\pm$ 7,50	110,00 $\pm$ 22,50	95,00 $\pm$ 12,50	0,62
Defeitos maiores (%)	23,25 $\pm$ 1,25	19,75 $\pm$ 0,75	23,25 $\pm$ 1,25	0,17
Defeitos menores (%)	3,75 $\pm$ 1,25	4,00 $\pm$ 1,50	3,00 $\pm$ 1,50	0,87
Defeitos totais (%)	27,00 $\pm$ 0,00	23,75 $\pm$ 2,25	26,25 $\pm$ 2,75	0,56
Motilidade total (%)	63,80 $\pm$ 2,40	67,40 $\pm$ 3,90	63,35 $\pm$ 2,15	0,61
Motilidade progressiva (%)	49,75 $\pm$ 3,95	48,40 $\pm$ 5,50	46,05 $\pm$ 1,85	0,81
Células rápidas (%)	60,75 $\pm$ 3,35	61,55 $\pm$ 7,35	59,50 $\pm$ 2,10	0,95
Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)	185,50 $\pm$ 2,70	184,90 $\pm$ 5,10	186,95 $\pm$ 7,65	0,96
Velocidade progressiva (VSL; μ m/s)	86,95 $\pm$ 0,85	84,60 $\pm$ 3,00	87,75 $\pm$ 6,15	0,85
Velocidade de trajeto (VAP; μ m/s)	105,30 $\pm$ 0,40	104,80 $\pm$ 3,00	108,50 $\pm$ 6,40	0,79
Linearidade (LIN; %)	46,85 $\pm$ 0,25	45,75 $\pm$ 0,35	46,90 $\pm$ 1,40	0,60
Retilinearidade (STR; %)	82,60 $\pm$ 0,40	80,70 $\pm$ 0,60	80,85 $\pm$ 0,85	0,21
Índice de oscilação (WOB; %)	56,80 $\pm$ 0,60	57,70 $\pm$ 0,10	58,00 $\pm$ 1,10	0,46
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; μ m)	3,80 $\pm$ 0,10	4,00 $\pm$ 0,20	3,90 $\pm$ 0,20	0,74
Frequência de batimento (BCF; Hz)	23,80 $\pm$ 0,50	21,75 $\pm$ 1,35	23,05 $\pm$ 1,25	0,49
PIAIA ¹ (%)	37,75 $\pm$ 0,25	33,75 $\pm$ 1,75	35,75 $\pm$ 2,75	0,43
Integridade de membrana plasmática (%)	43,00 $\pm$ 3,50	34,75 $\pm$ 2,75	38,75 $\pm$ 2,25	0,27
Integridade de membrana acrossomal (%)	60,50 $\pm$ 1,50	57,75 $\pm$ 1,25	57,75 $\pm$ 1,75	0,43
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	41,25 $\pm$ 1,25	35,75 $\pm$ 1,75	42,00 $\pm$ 2,50	0,17
Red ² (%)	7,00 $\pm$ 0,00	7,50 $\pm$ 4,50	8,75 $\pm$ 6,25	0,96

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹PIAIA: integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ² Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red®.

Tabela 20 – Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro BF-2

Características espermáticas morfofuncionais	Partidas			Valor de P
	BF-2-1	BF-2-2	BF-2-3	
Total de espermatozoides por palheta ($\times 10^6$)	15,31 $\pm$ 0,31	20,31 $\pm$ 2,18	17,19 $\pm$ 1,56	0,21
Total de espermatozoides móveis por palheta ($\times 10^6$)	9,19 $\pm$ 0,19	11,51 $\pm$ 0,26	10,31 $\pm$ 0,93	0,13
Motilidade subjetiva (%)	60,00 $\pm$ 0,00	57,50 $\pm$ 7,50	60,00 $\pm$ 0,00	0,89
Vigor (1-5)	3,25 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,25	3,00 $\pm$ 0,00	0,35
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	61,25 $\pm$ 1,25	81,25 $\pm$ 8,75	68,75 $\pm$ 6,25	0,22
Defeitos maiores (%)	27,75 $\pm$ 1,25	26,75 $\pm$ 2,75	27,25 $\pm$ 4,25	0,97
Defeitos menores (%)	3,50 $\pm$ 2,50	6,00 $\pm$ 4,50	6,00 $\pm$ 4,00	0,86
Defeitos totais (%)	31,25 $\pm$ 1,25	32,75 $\pm$ 7,25	33,25 $\pm$ 0,25	0,94
Motilidade total (%)	74,50 $\pm$ 0,90	69,60 $\pm$ 1,70	76,40 $\pm$ 3,70	0,26
Motilidade progressiva (%)	49,40 $\pm$ 3,50	57,50 $\pm$ 0,40	63,15 $\pm$ 2,75	0,07
Células rápidas (%)	66,05 $\pm$ 2,15	67,50 $\pm$ 2,20	70,35 $\pm$ 4,05	0,63
Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)	150,45 $\pm$ 7,45	160,05 $\pm$ 7,35	150,75 $\pm$ 3,75	0,55
Velocidade progressiva (VSL; μ m/s)	70,55 $\pm$ 7,05	87,90 $\pm$ 0,60	81,60 $\pm$ 3,90	0,16
Velocidade de trajeto (VAP; μ m/s)	90,80 $\pm$ 9,00	105,20 $\pm$ 2,00	94,75 $\pm$ 3,15	0,31
Linearidade (LIN; %)	46,75 $\pm$ 2,35	55,10 $\pm$ 2,90	54,10 $\pm$ 1,20	0,14
Retilinearidade (STR; %)	77,65 $\pm$ 0,05	83,65 $\pm$ 2,15	86,15 $\pm$ 1,25	0,05
Índice de oscilação (WOB; %)	60,20 $\pm$ 3,00	65,80 $\pm$ 1,80	62,85 $\pm$ 0,55	0,29
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; μ m)	2,85 $\pm$ 0,05	2,75 $\pm$ 0,05	2,80 $\pm$ 0,00	0,35
Frequência de batimento (BCF; Hz)	22,05 $\pm$ 1,15	26,60 $\pm$ 1,10	26,30 $\pm$ 0,80	0,08
PIAIA ¹ (%)	39,25 $\pm$ 2,75	38,50 $\pm$ 0,00	40,50 $\pm$ 0,50	0,70
Integridade de membrana plasmática (%)	41,25 $\pm$ 4,25	40,25 $\pm$ 1,25	41,25 $\pm$ 0,750	0,95
Integridade de membrana acrossomal (%)	56,00 $\pm$ 2,50	53,50 $\pm$ 4,50	51,75 $\pm$ 0,25	0,64
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	49,50 $\pm$ 3,00	49,50 $\pm$ 4,50	57,25 $\pm$ 3,25	0,35
Red ⁺ 2 (%)	11,50 $\pm$ 0,50	6,00 $\pm$ 5,00	4,50 $\pm$ 1,50	0,35

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹PIAIA: integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ²Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red®.

Tabela 21 – Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro BF-3

Características espermáticas morfofuncionais	Partidas			Valor de P
	BF-3-1	BF-3-2	BF-3-3	
Total de espermatozoides por palheta ($\times 10^6$)	26,25 $\pm$ 1,25	25,00 $\pm$ 1,25	27,19 $\pm$ 1,56	0,58
Total de espermatozoides móveis por palheta ($\times 10^6$)	17,06 $\pm$ 0,81	16,84 $\pm$ 0,21	18,31 $\pm$ 0,37	0,25
Motilidade subjetiva (%)	65,00 $\pm$ 0,00	67,50 $\pm$ 2,50	67,50 $\pm$ 2,50	0,64
Vigor (1-5)	3,50 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 0,00	.
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	105,00 $\pm$ 5,00	100,00 $\pm$ 5,00	108,75 $\pm$ 6,25	0,58
Defeitos maiores (%)	30,75 $\pm$ 0,25 ^a	24,25 $\pm$ 0,25 ^b	22,45 $\pm$ 1,54 ^b	0,01
Defeitos menores (%)	4,00 $\pm$ 2,00	4,25 $\pm$ 2,75	3,19 $\pm$ 1,30,00	0,93
Defeitos totais (%)	34,75 $\pm$ 1,75	28,50 $\pm$ 2,50	25,65 $\pm$ 2,85	0,15
Motilidade total (%)	76,85 $\pm$ 6,25	73,85 $\pm$ 6,25	81,65 $\pm$ 2,95	0,63
Motilidade progressiva (%)	51,10 $\pm$ 0,30 ^b	44,55 $\pm$ 0,55 ^c	62,50 $\pm$ 1,60 ^a	0,002
Células rápidas (%)	70,35 $\pm$ 4,15	67,45 $\pm$ 3,25	76,75 $\pm$ 2,55	0,28
Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)	181,15 $\pm$ 6,55	175,60 $\pm$ 0,40	179,80 $\pm$ 6,60	0,76
Velocidade progressiva (VSL; μ m/s)	86,90 $\pm$ 7,90	75,45 $\pm$ 1,55	93,55 $\pm$ 1,85	0,15
Velocidade de trajeto (VAP; μ m/s)	110,40 $\pm$ 4,40	102,80 $\pm$ 1,10	114,20 $\pm$ 3,10	0,17
Linearidade (LIN; %)	47,90 $\pm$ 2,60	43,00 $\pm$ 0,80	52,05 $\pm$ 0,85	0,06
Retilinearidade (STR; %)	78,60 $\pm$ 4,00	73,40 $\pm$ 0,70	81,90 $\pm$ 0,60	0,17
Índice de oscilação (WOB; %)	60,90 $\pm$ 0,20 ^{ab}	58,60 $\pm$ 0,50 ^b	63,55 $\pm$ 0,65 ^a	0,01
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; μ m)	3,80 $\pm$ 0,20	3,50 $\pm$ 0,20	3,35 $\pm$ 0,15	0,34
Frequência de batimento (BCF; Hz)	21,10 $\pm$ 1,10	20,95 $\pm$ 0,85	22,45 $\pm$ 0,25	0,45
PIAIA ¹ (%)	46,75 $\pm$ 5,75	49,25 $\pm$ 0,25	57,25 $\pm$ 3,75	0,29
Integridade de membrana plasmática (%)	66,25 $\pm$ 5,75	54,25 $\pm$ 2,25	61,25 $\pm$ 0,75	0,20
Integridade de membrana acrossomal (%)	55,25 $\pm$ 8,25	60,50 $\pm$ 3,50	66,00 $\pm$ 7,00	0,57
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	68,50 $\pm$ 2,50	64,00 $\pm$ 3,00	65,75 $\pm$ 1,25	0,48
Red+ ² (%)	15,50 $\pm$ 4,50	14,50 $\pm$ 1,50	20,50 $\pm$ 3,50	0,49

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹PIAIA: integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ²Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red[®].

Tabela 22 – Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro AF-1

Características espermáticas morfofuncionais	Partidas			Valor de P
	AF-1-1	AF-1-2	AF-1-3	
Total de espermatozoides por palheta ($\times 10^6$)	19,38 $\pm$ 5,00	33,75 $\pm$ 1,87	26,25 $\pm$ 3,12	0,14
Total de espermatozoides móveis por palheta ($\times 10^6$)	12,95 $\pm$ 2,89	21,05 $\pm$ 0,33	16,33 $\pm$ 1,30	0,11
Motilidade subjetiva (%)	67,50 $\pm$ 2,50	62,50 $\pm$ 2,50	62,50 $\pm$ 2,50	0,38
Vigor (1-5)	3,25 $\pm$ 0,25 ^{ab}	3,50 $\pm$ 0,00 ^a	2,50 $\pm$ 0,00 ^b	0,03
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	77,50 $\pm$ 20,00	135,00 $\pm$ 7,50	105,00 $\pm$ 12,50	0,14
Defeitos maiores (%)	20,75 $\pm$ 3,25	13,17 $\pm$ 2,17	22,00 $\pm$ 4,00	0,25
Defeitos menores (%)	9,25 $\pm$ 6,75	2,36 $\pm$ 1,36	7,25 $\pm$ 5,75	0,66
Defeitos totais (%)	30,00 $\pm$ 3,50	15,53 $\pm$ 3,53	29,25 $\pm$ 9,75	0,32
Motilidade total (%)	81,20 $\pm$ 4,60	75,10 $\pm$ 6,00	72,20 $\pm$ 4,00	0,50
Motilidade progressiva (%)	54,15 $\pm$ 0,85	52,85 $\pm$ 1,35	43,25 $\pm$ 12,15	0,55
Células rápidas (%)	76,00 $\pm$ 4,20	70,15 $\pm$ 4,55	65,20 $\pm$ 1,00	0,25
Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)	160,35 $\pm$ 2,85	158,15 $\pm$ 7,15	136,55 $\pm$ 11,15	0,20
Velocidade progressiva (VSL; μ m/s)	75,95 $\pm$ 1,95	80,05 $\pm$ 80,15	62,60 $\pm$ 12,90	0,44
Velocidade de trajeto (VAP; μ m/s)	99,15 $\pm$ 1,05	100,55 $\pm$ 5,25	81,75 $\pm$ 7,75	0,15
Linearidade (LIN; %)	47,35 $\pm$ 0,35	50,45 $\pm$ 2,85	45,35 $\pm$ 5,75	0,65
Retilinearidade (STR; %)	76,55 $\pm$ 1,15	79,40 $\pm$ 3,90	75,70 $\pm$ 8,60	0,88
Índice de oscilação (WOB; %)	61,85 $\pm$ 0,45 ^{ab}	63,55 $\pm$ 0,45 ^a	59,85 $\pm$ 0,75 ^b	0,04
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; μ m)	2,85 $\pm$ 0,05	2,75 $\pm$ 0,05	2,70 $\pm$ 0,10	0,42
Frequência de batimento (BCF; Hz)	21,80 $\pm$ 0,80	23,65 $\pm$ 1,45	21,00 $\pm$ 1,40	0,41
PIAIA ¹ (%)	58,25 $\pm$ 2,75 ^a	34,25 $\pm$ 3,25 ^b	37,25 $\pm$ 1,75 ^b	0,01
Integridade de membrana plasmática (%)	61,50 $\pm$ 0,00 ^a	35,25 $\pm$ 3,25 ^b	39,00 $\pm$ 2,50 ^b	0,008
Integridade de membrana acrossomal (%)	67,25 $\pm$ 6,75 ^a	41,25 $\pm$ 0,75 ^b	44,75 $\pm$ 0,75 ^b	0,03
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	78,00 $\pm$ 6,50	54,75 $\pm$ 11,25	73,00 $\pm$ 3,50	0,23
Red+ ² (%)	5,50 $\pm$ 0,50	16,50 $\pm$ 5,50	5,50 $\pm$ 1,50	0,15

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹PIAIA: integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ² Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red[®].

Tabela 23 – Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro AF-2

Características espermáticas morfofuncionais	Partidas			Valor de P
	AF-2-1	AF-2-2	AF-2-3	
Total de espermatozoides por palheta ($\times 10^6$)	29,94 $\pm$ 4,06	21,56 $\pm$ 2,18	28,13 $\pm$ 5,00	0,55
Total de espermatozoides móveis por palheta ($\times 10^6$)	18,25 $\pm$ 4,25	13,90 $\pm$ 0,34	19,11 $\pm$ 4,08	0,57
Motilidade subjetiva (%)	67,50 $\pm$ 7,50	65,00 $\pm$ 5,00	67,50 $\pm$ 2,50	0,93
Vigor (1-5)	3,50 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 0,00	3,75 $\pm$ 0,25	0,46
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	103,75 $\pm$ 16,25	86,25 $\pm$ 8,75	112,50 $\pm$ 20	0,55
Defeitos maiores (%)	7,75 $\pm$ 0,25 ^b	16,25 $\pm$ 1,25 ^a	8,75 $\pm$ 2,25 ^{ab}	0,04
Defeitos menores (%)	1,50 $\pm$ 0,00	1,75 $\pm$ 0,75	3,00 $\pm$ 2,00	0,68
Defeitos totais (%)	9,25 $\pm$ 0,25	18,00 $\pm$ 2,00	11,75 $\pm$ 4,25	0,20
Motilidade total (%)	70,50 $\pm$ 1,60	76,50 $\pm$ 2,90	80,50 $\pm$ 2,20	0,11
Motilidade progressiva (%)	55,00 $\pm$ 0,90 ^b	59,30 $\pm$ 3,10 ^{ab}	68,20 $\pm$ 1,50 ^a	0,04
Células rápidas (%)	64,15 $\pm$ 0,95 ^b	69,95 $\pm$ 2,45 ^{ab}	75,55 $\pm$ 0,45 ^a	0,03
Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)	149,70 $\pm$ 12,70	146,90 $\pm$ 1,30	139,80 $\pm$ 0,70	0,66
Velocidade progressiva (VSL; μ m/s)	88,55 $\pm$ 4,95	81,90 $\pm$ 0,50	87,20 $\pm$ 4,60	0,52
Velocidade de trajeto (VAP; μ m/s)	102,75 $\pm$ 5,95	97,05 $\pm$ 0,25	99,40 $\pm$ 2,90	0,62
Linearidade (LIN; %)	59,30 $\pm$ 1,70	55,80 $\pm$ 0,80	62,35 $\pm$ 2,95	0,21
Retilinearidade (STR; %)	86,20 $\pm$ 0,20	84,40 $\pm$ 0,30	87,65 $\pm$ 2,05	0,30
Índice de oscilação (WOB; %)	68,75 $\pm$ 1,85	66,05 $\pm$ 0,75	71,10 $\pm$ 1,70	0,20
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; μ m)	2,75 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,05	2,45 $\pm$ 0,05	0,38
Frequência de batimento (BCF; Hz)	23,65 $\pm$ 0,45	23,25 $\pm$ 0,55	23,05 $\pm$ 0,05	0,62
PIAIA ¹ (%)	45,75 $\pm$ 8,75	49,00 $\pm$ 8,00	43,25 $\pm$ 4,75	0,86
Integridade de membrana plasmática (%)	47,00 $\pm$ 10	49,75 $\pm$ 8,75	44,75 $\pm$ 4,75	0,91
Integridade de membrana acrossomal (%)	55,25 $\pm$ 4,75	60,25 $\pm$ 9,75	55,00 $\pm$ 1,00	0,81
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	53,25 $\pm$ 11,25	56,75 $\pm$ 8,25	52,00 $\pm$ 9,50	0,93
Red+ ² (%)	5,50 $\pm$ 3,50	4,50 $\pm$ 3,50	3,50 $\pm$ 2,50	0,90

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹PIAIA: integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ²Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red®.

Tabela 24 – Média e erro padrão da média das características morfofuncionais espermáticas das três partidas do touro AF-3

Características espermáticas morfofuncionais	Partidas			Valor de P
	AF-3-1	AF-3-2	AF-3-3	
Total de espermatozoides por palheta ($\times 10^6$)	20,00 $\pm$ 1,25	27,50 $\pm$ 3,12	24,38 $\pm$ 5,00	0,42
Total de espermatozoides móveis por palheta ($\times 10^6$)	14,00 $\pm$ 0,87	19,25 $\pm$ 2,19	15,59 $\pm$ 2,03	0,25
Motilidade subjetiva (%)	70,00 $\pm$ 0,00	70,00 $\pm$ 0,00	65,00 $\pm$ 5,00	0,46
Vigor (1-5)	3,50 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 0,00	.
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	80,00 $\pm$ 5,00	110,00 $\pm$ 12,50	97,50 $\pm$ 20	0,42
Defeitos maiores (%)	20,00 $\pm$ 5,00	33,00 $\pm$ 1,50	26,75 $\pm$ 2,25	0,14
Defeitos menores (%)	7,25 $\pm$ 5,25	4,75 $\pm$ 0,75	4,75 $\pm$ 3,25	0,85
Defeitos totais (%)	25,25 $\pm$ 10,25	37,75 $\pm$ 2,25	31,50 $\pm$ 5,50	0,60
Motilidade total (%)	84,95 $\pm$ 1,65	85,45 $\pm$ 0,85	63,55 $\pm$ 7,55	0,06
Motilidade progressiva (%)	49,20 $\pm$ 2,10	60,05 $\pm$ 4,55	50,00 $\pm$ 1,30	0,13
Células rápidas (%)	75,15 $\pm$ 1,65	79,30 $\pm$ 2,50	59,00 $\pm$ 7,70	0,10
Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)	133,95 $\pm$ 2,75 ^b	140,05 $\pm$ 1,15 ^{ab}	146,70 $\pm$ 0,40 ^a	0,03
Velocidade progressiva (VSL; μ m/s)	63,85 $\pm$ 1,15	80,55 $\pm$ 5,75	84,55 $\pm$ 7,85	0,15
Velocidade de trajeto (VAP; μ m/s)	86,45 $\pm$ 0,05	99,55 $\pm$ 4,55	98,70 $\pm$ 4,90	0,15
Linearidade (LIN; %)	47,75 $\pm$ 1,85	57,50 $\pm$ 3,60	57,60 $\pm$ 5,20	0,25
Retilinearidade (STR; %)	73,85 $\pm$ 1,35	80,80 $\pm$ 2,10	85,45 $\pm$ 3,65	0,10
Índice de oscilação (WOB; %)	64,75 $\pm$ 1,15	71,05 $\pm$ 2,65	67,25 $\pm$ 3,15	0,32
Deslocamento lateral da cabeça (ALH; μ m)	2,60 $\pm$ 0,10	2,45 $\pm$ 0,05	2,70 $\pm$ 0,10	0,26
Frequência de batimento (BCF; Hz)	20,55 $\pm$ 0,05 ^b	20,95 $\pm$ 0,25 ^b	22,75 $\pm$ 0,15 ^a	0,005
PIAIA ¹ (%)	45,25 $\pm$ 3,75 ^a	41,75 $\pm$ 1,75 ^a	29,75 $\pm$ 1,75 ^b	0,04
Integridade de membrana plasmática (%)	48,25 $\pm$ 3,75 ^a	43,75 $\pm$ 1,75 ^a	30,50 $\pm$ 1,00 ^b	0,02
Integridade de membrana acrossomal (%)	60,00 $\pm$ 6,00	56,00 $\pm$ 2,00	41,00 $\pm$ 2,00	0,07
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	57,75 $\pm$ 5,25	57,50 $\pm$ 6,00	39,00 $\pm$ 3,50	0,12
Red+ ² (%)	6,50 $\pm$ 5,50	39,50 $\pm$ 39,50	4,50 $\pm$ 1,50	0,55

Fonte: Alves (2018).

Legenda: ¹PIAIA: integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; ²Red+: espermatozoides positivos para as espécies reativas ao oxigênio por meio da sonda CellROX Deep Red[®].

APÊNDICE F – RELAÇÃO DOS MICRORNAS DETECTADOS NOS ESPERMATOZOIDES DOS TOUROS DE ALTA E BAIXA FERTILIDADE E NOS OÓCITOS MATURADOS *IN VITRO*

miRNA	Espermatozoides				Oócito maduro <i>in vitro</i> (n=3)		
	Alta Fertilidade (n=3)		Baixa Fertilidade (n=3)				
bta-let-7a-3p	0,0082	± 0,0029	0,0052	± 0,0064	.	±	.
bta-let-7a-5p	0,0787	± 0,0399	0,0820	± 0,0179	0,0060	±	0,0017
bta-let-7b	.	±	0,0878	± 0,1248	0,0021	±	0,0016
bta-let-7c	0,0655	± 0,0376	0,0462	± 0,0203	0,0056	±	0,0034
bta-let-7d	0,0275	± 0,0122	0,0283	± 0,0087	0,0067	±	0,0018
bta-let-7e	0,1503	± 0,0720	0,1566	± 0,0185	0,0198	±	0,0155
bta-let-7f	0,0064	± 0,0042	0,0104	± 0,0054	0,0021	±	0,0015
bta-let-7g	0,0245	± 0,0080	0,0114	± 0,0138	0,0042	±	0,0022
bta-let-7i	0,0116	± 0,0091	0,0065	± 0,0037	0,0072	±	0,0045
bta-miR-1	.	±	.	±	.	±	.
bta-miR-100	0,9619	± 0,6599	1,2005	± 0,9492	0,0136	±	0,0020
bta-miR-101	0,0882	± 0,1035	0,1185	± 0,1503	0,0057	±	0,0034
bta-miR-103	0,0598	± 0,0553	0,0660	± 0,0652	0,0065	±	0,0047
bta-miR-105a	0,0014	± 0,0015	0,0014	± 0,0010	0,0075	±	0,0089
bta-miR-105b	0,0034	± 0,0011	0,0015	± 0,0011	0,0137	±	0,0083
bta-miR-106a	0,6168	± 0,6309	0,5302	± 0,4100	0,0466	±	0,0238
bta-miR-106b	0,1893	± 0,1984	0,1591	± 0,1428	0,0124	±	0,0061
bta-miR-107	.	±	0,0006	± 0,0001	0,1329	±	0,1836
bta-miR-10a	0,3017	± 0,1970	0,4891	± 0,0931	0,0454	±	0,0070
bta-miR-10b	0,0049	± 0,0028	0,0059	± 0,0032	0,0429	±	0,0074
bta-miR-1179	.	±	.	±	0,0090	±	0,0124
bta-miR-1185	.	±	.	±	.	±	.
bta-miR-1193	.	±	.	±	0,0185	±	0,0213
bta-miR-1197	.	±	.	±	.	±	.
bta-miR-122	0,0064	± 0,0040	0,0140	± 0,0030	0,0044	±	0,0033
bta-miR-122	0,0079	± 0,0052	0,0121	± 0,0042	0,0036	±	0,0031
bta-miR-1224	3,2663	± 1,3077	3,1231	± 0,5453	2,3409	±	0,6572
bta-miR-1225-3p	0,3219	± 0,1637	.	±	26,8475	±	0,9828
bta-miR-1246	0,9191	± 0,4005	1,2088	± 0,4008	12,6860	±	4,3288
bta-miR-1247-3p	0,0213	± 0,0070	0,0135	± 0,0013	0,2544	±	0,1685
bta-miR-1247-5p	0,3421	± 0,1552	0,3060	± 0,1354	0,4988	±	0,2081
bta-miR-1248	.	±	.	±	0,0205	±	0,0186
bta-miR-1249	0,0018	± 0,0013	0,0014	± 0,0012	0,0401	±	0,0039
bta-miR-124a	0,0002	± 0,0001	0,0009	± 0,0008	0,0065	±	0,0030
bta-miR-124b	0,0009	± 0,0006	0,0003	± 0,0001	0,0073	±	0,0037

bta-miR-125a	0,0045	±	0,0027	0,0079	±	0,0099	0,0117	±	0,0169
bta-miR-125b	0,5888	±	0,5419	0,7015	±	0,8170	0,0044	±	0,0007
bta-miR-1260b	39,7555	±	33,8572	35,3772	±	7,6421	22,6233	±	17,8693
bta-miR-126-3p	0,0090	±	0,0019	0,0062	±	0,0026	0,0919	±	0,1301
bta-miR-126-5p	0,0103	±	0,0030	0,0063	±	0,0008	0,0869	±	0,1112
bta-miR-127	0,0080	±	0,0044	0,0045	±	0,0010	0,0416	±	0,0009
bta-miR-1271	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1277	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-128	0,0091	±	0,0079	0,0087	±	0,0104	0,0016	±	0,0011
bta-miR-1281	0,0342	±	0,0186	0,0377	±	0,0167	2,7083	±	0,2929
bta-miR-1282	.	±	.	.	±	.	0,0031	±	0,0026
bta-miR-1284	.	±	.	.	±	.	0,0202	±	0,0191
bta-miR-1287	0,0022	±	0,0012	0,0008	±	0,0005	0,0622	±	0,0610
bta-miR-129	0,0025	±	0,0016	0,0040	±	0,0027	0,0253	±	0,0076
bta-miR-1291	0,0005	±	0,0003	0,0014	±	0,0008	0,0118	±	0,0070
bta-miR-129-3p	.	±	.	0,0005	±	0,0002	0,0038	±	0,0020
bta-miR-129-5p	0,0023	±	0,0010	0,0035	±	0,0029	0,0136	±	0,0014
bta-miR-1296	0,0181	±	0,0065	0,0193	±	0,0015	.	±	.
bta-miR-1298	.	±	.	.	±	.	0,0032	±	0,0022
bta-miR-1301	.	±	.	.	±	.	0,0099	±	0,0094
bta-miR-1306	0,0258	±	0,0200	0,0246	±	0,0120	0,3889	±	0,3027
bta-miR-1307	0,0654	±	0,0223	0,1022	±	0,0375	0,7877	±	0,2135
bta-miR-130a	0,0068	±	0,0050	0,0036	±	0,0009	0,0135	±	0,0029
bta-miR-130b	0,0101	±	0,0027	0,0079	±	0,0030	0,0222	±	0,0077
bta-miR-132	0,1163	±	0,0001	0,1441	±	0,0320	0,1328	±	0,2099
bta-miR-133a	0,0012	±	0,0008	0,0013	±	0,0013	0,1335	±	0,1083
bta-miR-133b	0,0004	±	0,0003	.	±	.	0,0074	±	0,0071
bta-miR-133c	.	±	.	.	±	.	0,0857	±	0,1468
bta-miR-134	0,0033	±	0,0003	0,0024	±	0,0012	0,1272	±	0,2080
bta-miR-1343-3p	0,0224	±	0,0115	0,0252	±	0,0090	0,3794	±	0,0953
bta-miR-1343-5p	1,2755	±	0,6539	0,9952	±	0,1259	0,4247	±	0,1212
bta-miR-135a	0,0134	±	0,0061	0,0220	±	0,0126	.	±	.
bta-miR-135b	0,0062	±	0,0045	0,0147	±	0,0144	0,0003	±	0,0000
bta-miR-136	0,0030	±	0,0029	0,0005	±	0,0000	.	±	.
bta-miR-137	.	±	.	0,0027	±	0,0015	0,0011	±	0,0002
bta-miR-138	0,0119	±	0,0042	0,0090	±	0,0041	0,2403	±	0,2825
bta-miR-1388-3p	0,0090	±	0,0056	0,0060	±	0,0019	0,1593	±	0,0131
bta-miR-139	0,0093	±	0,0071	0,0043	±	0,0031	0,0222	±	0,0208
bta-miR-140	0,0084	±	0,0109	0,0072	±	0,0100	0,0238	±	0,0370
bta-miR-141	0,0048	±	0,0065	0,0065	±	0,0067	0,0392	±	0,0361
bta-miR-142-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-142-5p	0,0009	±	0,0009	.	±	.	.	±	.
bta-miR-143	0,0697	±	0,0383	0,0843	±	0,0201	0,0253	±	0,0310

bta-miR-144	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-145	0,0008	±	0,0001	0,0005	±	.	0,1698	±	0,1044
bta-miR-146a	0,0142	±	0,0129	0,0166	±	.	0,0051	±	0,0037
bta-miR-146b	.	±	.	0,0066	±	0,0039	0,0080	±	0,0064
bta-miR-147	0,0028	±	0,0011	0,0042	±	.	0,0008	±	0,0009
bta-miR-148a	.	±	.	0,0271	±	0,0317	0,1130	±	0,0373
bta-miR-148b	0,0292	±	0,0384	0,0332	±	0,0408	0,0658	±	0,0205
bta-miR-149-3p	0,5544	±	0,1471	0,5893	±	0,4360	0,3350	±	0,0541
bta-miR-149-5p	0,0011	±	0,0008	.	±	.	1,5298	±	1,5311
bta-miR-150	0,0068	±	0,0009	0,0063	±	0,0059	0,0364	±	0,0450
bta-miR-151-3p	0,0404	±	0,0098	0,0342	±	0,0054	0,0288	±	0,0273
bta-miR-151-5p	0,2233	±	0,1935	0,3127	±	0,2565	0,0280	±	0,0040
bta-miR-152	0,0021	±	0,0012	0,0027	±	0,0003	0,0572	±	0,0963
bta-miR-153	0,0075	±	0,0101	0,0091	±	0,0098	0,0094	±	0,0068
bta-miR-154a	0,0008	±	0,0008	0,0008	±	0,0001	0,0605	±	0,0887
bta-miR-154b	0,0355	±	0,0122	0,0224	±	0,0081	0,2430	±	0,3430
bta-miR-154c	0,0012	±	0,0005	0,0017	±	.	0,0114	±	0,0187
bta-miR-155	.	±	.	.	±	.	0,0170	±	0,0238
bta-miR-15a	0,7730	±	0,7098	1,0576	±	0,9029	0,0422	±	0,0035
bta-miR-15b	1,5945	±	1,5854	1,7931	±	1,6892	0,0134	±	0,0051
bta-miR-16a	2,2002	±	1,8295	2,5497	±	2,7160	0,1019	±	0,0280
bta-miR-16b	5,3977	±	4,7208	4,0805	±	2,1031	0,2727	±	0,2049
bta-miR-17-3p	.	±	.	0,0016	±	0,0012	0,0060	±	0,0038
bta-miR-17-5p	0,0725	±	0,0696	0,0549	±	0,0341	0,0171	±	0,0024
bta-miR-181a	0,0010	±	0,0008	0,0026	±	0,0023	0,0006	±	0,0002
bta-miR-181b	0,0012	±	0,0005	0,0022	±	0,0027	0,0078	±	0,0023
bta-miR-181c	,	±	.	0,0017	±	0,0006	.	±	.
bta-miR-181d	0,0010	±	0,0010	0,0013	±	0,0015	0,0344	±	0,0446
bta-miR-182	.	±	.	.	±	.	0,0238	±	0,0328
bta-miR-183	.	±	.	.	±	.	0,0519	±	0,0370
bta-miR-184	0,0016	±	0,0010	0,0008	±	0,0008	.	±	.
bta-miR-185	0,0008	±	0,0004	0,0029	±	0,0031	0,0050	±	0,0022
bta-miR-186	0,0385	±	0,0329	0,0441	±	0,0437	0,0322	±	0,0373
bta-miR-187	0,0095	±	0,0028	0,0061	±	0,0017	0,0954	±	0,0535
bta-miR-188	0,0128	±	0,0056	0,0122	±	0,0043	0,0277	±	0,0103
bta-miR-18a	0,0863	±	0,0674	0,0838	±	0,0811	0,0102	±	0,0044
bta-miR-18b	0,0289	±	0,0261	0,0212	±	0,0202	0,0023	±	0,0016
bta-miR-190a	0,0010	±	0,0001	0,0014	±	0,0006	0,0080	±	0,0085
bta-miR-190b	0,0326	±	0,0126	0,0361	±	0,0072	0,0058	±	0,0023
bta-miR-191	0,0526	±	0,0461	0,0566	±	0,0330	0,0654	±	0,0763
bta-miR-192	0,0160	±	0,0122	0,0180	±	0,0156	0,0069	±	0,0010
bta-miR-193a	.	±	.	.	±	.	0,0006	±	0,0004
bta-miR-193a-3p	0,0006	±	0,0004	0,0008	±	0,0004	0,0029	±	0,0002
bta-miR-193a-5p	0,0027	±	0,0020	0,0026	±	0,0028	0,0102	±	0,0014

bta-miR-193b	0,0004	±	0,0001	0,0004	±	0,0004	0,0020	±	0,0020
bta-miR-194	0,0202	±	0,0093	0,0463	±	0,0416	0,0073	±	0,0051
bta-miR-195	.	±	.	0,7969	±	0,7520	0,0367	±	0,0193
bta-miR-196a	0,0067	±	0,0020	0,0099	±	0,0053	0,0633	±	0,0871
bta-miR-196b	0,0040	±	0,0046	0,0033	±	0,0013	0,0054	±	0,0083
bta-miR-197	.	±	.	.	±	.	0,4294	±	0,5134
bta-miR-199a-3p	0,0010	±	0,0003	0,0015	±	0,0010	.	±	.
bta-miR-199a-5p	.	±	.	.	±	.	0,0009	±	0,0007
bta-miR-199b	.	±	.	.	±	.	0,0319	±	0,0304
bta-miR-199c	0,0023	±	0,0006	0,0037	±	0,0022	0,0487	±	0,0740
bta-miR-19a	0,0286	±	0,0337	0,0134	±	0,0198	0,0377	±	0,0034
bta-miR-19b	0,0349	±	0,0414	0,0158	±	0,0150	0,0462	±	0,0296
bta-miR-200a	0,0550	±	0,0092	0,0607	±	0,0690	.	±	.
bta-miR-200b	0,2199	±	0,1115	0,3415	±	0,0697	0,0109	±	0,0144
bta-miR-200c	0,0097	±	0,0051	0,0141	±	0,0025	0,0119	±	0,0172
bta-miR-202	.	±	.	.	±	.	0,0033	±	0,0014
bta-miR-204	0,2858	±	0,2761	0,3263	±	0,2577	0,0809	±	0,1048
bta-miR-205	0,0018	±	0,0002	0,0006	±	0,0002	0,0512	±	0,0420
bta-miR-206	0,0021	±	0,0016	0,0014	±	0,0008	0,0838	±	0,1251
bta-miR-208a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-208b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-20a	0,7040	±	0,6306	0,4886	±	0,3146	0,0443	±	0,0072
bta-miR-20b	0,2230	±	0,2159	0,2580	±	0,1985	0,0225	±	0,0039
bta-miR-210	0,0135	±	0,0061	0,0119	±	0,0082	0,0353	±	0,0061
bta-miR-211	0,2784	±	0,2428	0,2881	±	0,2613	0,7258	±	1,1919
bta-miR-212	0,0017	±	0,0000	.	±	.	0,0071	±	0,0088
bta-miR-21-3p	.	±	.	0,0001	±	0,0000	0,0051	±	0,0020
bta-miR-214	0,0033	±	0,0005	0,0059	±	0,0020	0,0202	±	0,0012
bta-miR-215	0,0084	±	0,0054	0,0107	±	0,0087	0,0050	±	0,0030
bta-miR-21-5p	0,0134	±	0,0128	0,0133	±	0,0020	0,0037	±	0,0028
bta-miR-216a	0,0017	±	0,0018	0,0047	±	0,0024	0,0256	±	0,0060
bta-miR-216b	0,0100	±	0,0045	0,0166	±	0,0022	0,0016	±	0,0014
bta-miR-217	0,0003	±	0,0001	0,0004	±	0,0003	.	±	.
bta-miR-218	0,0009	±	0,0007	.	±	.	0,0031	±	0,0041
bta-miR-219	0,0027	±	0,0011	.	±	.	0,0703	±	0,0348
bta-miR-219-3p	0,0015	±	0,0014	0,0008	±	0,0004	0,0245	±	0,0300
bta-miR-219-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-221	.	±	.	.	±	.	0,0199	±	0,0074
bta-miR-222	0,0009	±	0,0005	0,0009	±	0,0007	0,0355	±	0,0280
bta-miR-223	.	±	.	.	±	.	0,0089	±	0,0064
bta-miR-22-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-224	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-22-5p	0,0018	±	0,0014	0,0026	±	0,0037	0,0120	±	0,0038
bta-miR-23a	0,0625	±	0,0436	0,0895	±	0,0414	0,0119	±	0,0055

bta-miR-23b-3p	0,0017	±	0,0014	0,0031	±	0,0013	0,0526	±	0,0702
bta-miR-23b-5p	.	±	.	.	±	.	0,0016	±	0,0009
bta-miR-24	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-24-3p	0,0235	±	0,0144	0,0190	±	0,0238	0,0142	±	0,0032
bta-miR-25	0,1769	±	0,0393	0,2059	±	0,1237	0,0092	±	0,0045
bta-miR-26a	0,0563	±	0,0559	0,0460	±	0,0361	0,0848	±	0,0746
bta-miR-26b	0,0032	±	0,0003	0,0032	±	0,0031	0,0060	±	0,0071
bta-miR-26c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-27a-3p	0,2037	±	0,2382	0,1972	±	0,2456	0,0522	±	0,0674
bta-miR-27a-5p	0,0010	±	0,0005	,	±	,	0,0035	±	0,0021
bta-miR-27b	0,0973	±	0,0979	0,0931	±	0,0757	0,0795	±	0,0772
bta-miR-28	0,0047	±	0,0014	0,0039	±	0,0017	.	±	.
bta-miR-296-3p	0,0088	±	0,0074	0,0075	±	0,0020	0,1602	±	0,1695
bta-miR-296-5p	0,0358	±	0,0255	0,0362	±	0,0210	1,4022	±	1,0605
bta-miR-299	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-29a	0,1277	±	0,1156	0,1502	±	0,1266	.	±	.
bta-miR-29b	0,0215	±	0,0137	0,0236	±	0,0292	0,0027	±	0,0023
bta-miR-29c	0,1176	±	0,1196	0,1621	±	0,1269	0,0027	±	0,0008
bta-miR-29d-3p	0,0157	±	0,0066	0,0176	±	0,0181	.	±	.
bta-miR-29d-5p	0,0012	±	0,0014	0,0027	±	0,0025	0,0027	±	0,0012
bta-miR-29e	0,0059	±	0,0033	0,0094	±	0,0063	.	±	.
bta-miR-301a	.	±	.	0,0003	±	0,0003	.	±	.
bta-miR-301b	0,0002	±	0,0002	.	±	.	.	±	.
bta-miR-302a	.	±	.	0,0017	±	0,0020	.	±	.
bta-miR-302b	0,0007	±	0,0004	.	±	.	.	±	.
bta-miR-302c	0,0022	±	0,0017	0,0006	±	0,0002	0,0214	±	0,0358
bta-miR-302d	.	±	.	.	±	.	0,0025	±	0,0006
bta-miR-3064	.	±	.	.	±	.	0,0025	±	0,0006
bta-miR-30a-5p	0,0515	±	0,0559	0,0891	±	0,0726	0,0143	±	0,0075
bta-miR-30b-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-30b-5p	0,0627	±	0,0710	0,0600	±	0,0516	0,0468	±	0,0234
bta-miR-30c	0,0508	±	0,0584	0,0414	±	0,0491	0,1560	±	0,2161
bta-miR-30d	0,0606	±	0,0541	0,0517	±	0,0568	0,0136	±	0,0089
bta-miR-30e-5p	0,0652	±	0,0615	0,0634	±	0,0689	0,0164	±	0,0013
bta-miR-30f	0,0131	±	0,0024	0,0037	±	0,0030	0,0151	±	0,0088
bta-miR-31	0,0022	±	0,0003	.	±	.	0,0146	±	0,0072
bta-miR-32	0,0006	±	0,0005	.	±	.	.	±	.
bta-miR-320a	0,0427	±	0,0173	0,0325	±	0,0064	0,0776	±	0,0262
bta-miR-320b	0,0052	±	0,0015	0,0058	±	0,0015	0,0178	±	0,0134
bta-miR-323	133,0693	±	68,9476	101,8617	±	48,3551	535,5672	±	82,9623
bta-miR-324	0,0065	±	0,0045	0,0062	±	0,0026	0,0116	±	0,0124
bta-miR-326	0,0124	±	0,0061	0,0154	±	0,0118	0,0669	±	0,0070
bta-miR-328	0,0076	±	0,0037	0,0088	±	0,0068	0,0182	±	0,0136
bta-miR-329a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-329b	.	±	.	.	±	.	.	±	.

bta-miR-330	0,0050	±	0,0053	0,0040	±	0,0030	0,0194	±	0,0080
bta-miR-331-3p	0,0009	±	0,0001	.	±	.	.	±	.
bta-miR-331-5p	0,0026	±	0,0014	0,0020	±	0,0008	0,0272	±	0,0165
bta-miR-335	0,0520	±	0,0597	0,0476	±	0,0568	.	±	.
bta-miR-338	0,0017	±	0,0000	0,0055	±	0,0049	0,0092	±	0,0055
bta-miR-339a	0,0082	±	0,0030	0,0142	±	0,0039	0,0796	±	0,0611
bta-miR-339b	0,0110	±	0,0035	0,0135	±	0,0120	0,2950	±	0,3178
bta-miR-33a	.	±	.	.	±	.	0,0021	±	0,0002
bta-miR-33b	0,0004	±	0,0002	0,0002	±	0,0000	0,0007	±	0,0006
bta-miR-340	.	±	.	.	±	.	0,1876	±	0,2809
bta-miR-342	.	±	.	.	±	.	0,0220	±	0,0215
bta-miR-345-3p	0,0021	±	0,0015	0,0024	±	0,0010	0,0209	±	0,0037
bta-miR-345-5p	0,0028	±	0,0017	0,0042	±	0,0020	0,0200	±	0,0108
bta-miR-346	0,0240	±	0,0121	0,0217	±	0,0147	0,3168	±	0,0560
bta-miR-34a	0,0342	±	0,0412	0,0146	±	0,0034	0,0070	±	0,0070
bta-miR-34b	0,3081	±	0,3086	0,5956	±	0,6895	0,0157	±	0,0056
bta-miR-34c	0,3413	±	0,3560	0,6209	±	0,7448	0,0203	±	0,0195
bta-miR-361	.	±	.	0,0002	±	0,0001	0,0065	±	0,0043
bta-miR-362-3p	.	±	.	0,0013	±	0,0012	0,0144	±	0,0157
bta-miR-362-5p	.	±	.	0,0003	±	0,0003	0,0025	±	0,0010
bta-miR-363	0,0024	±	0,0024	0,0033	±	0,0034	0,0140	±	0,0041
bta-miR-365-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-365-5p	0,0034	±	0,0002	0,0057	±	0,0012	0,0174	±	0,0041
bta-miR-367	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-369-3p	0,0034	±	0,0024	0,0020	±	0,0014	.	±	.
bta-miR-369-5p	.	±	.	.	±	.	0,0388	±	0,0515
bta-miR-370	0,0033	±	0,0027	0,0031	±	0,0010	0,0255	±	0,0075
bta-miR-371	.	±	.	0,0005	±	0,0005	0,0018	±	0,0013
bta-miR-374a	0,0017	±	0,0012	0,0021	±	0,0001	.	±	.
bta-miR-374b	0,0022	±	0,0009	0,0041	±	0,0008	.	±	.
bta-miR-375	0,2240	±	0,0873	0,2036	±	0,0566	0,0753	±	0,1085
bta-miR-376a	.	±	.	0,0003	±	0,0001	.	±	.
bta-miR-376b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-376c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-376d	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-376e	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-377	,	±	,	0,0010	±	0,0006	0,0007	±	0,0005
bta-miR-378	0,0024	±	0,0022	0,0025	±	0,0014	0,1925	±	0,1854
bta-miR-378b	0,0016	±	0,0008	0,0015	±	0,0009	0,1624	±	0,1365
bta-miR-378c	.	±	.	0,0013	±	0,0009	0,0020	±	0,0020
bta-miR-378d	0,0023	±	0,0025	0,0013	±	0,0003	0,2972	±	0,2940
bta-miR-379	.	±	.	0,0007	±	0,0004	0,0023	±	0,0011
bta-miR-380-3p	0,0013	±	0,0001	.	±	.	0,0206	±	0,0159
bta-miR-380-5p	0,0214	±	0,0056	0,0099	±	0,0087	0,2800	±	0,2844
bta-miR-381	0,0043	±	0,0031	0,0023	±	0,0028	0,0056	±	0,0016

bta-miR-382	0,0304	±	0,0095	0,0207	±	0,0184	0,1174	±	0,0504
bta-miR-383	0,0022	±	0,0006	0,0014	±	0,0008	0,0198	±	0,0199
bta-miR-409a	0,0045	±	0,0072	0,0006	±	0,0002	.	±	.
bta-miR-409b	.	±	.	.	±	.	0,0360	±	0,0278
bta-miR-410	0,0004	±	0,0001	0,0004	±	0,0001	0,0049	±	0,0044
bta-miR-411a	0,0036	±	0,0018	0,0022	±	0,0017	0,0403	±	0,0310
bta-miR-411b	0,0003	±	0,0002	.	±	.	0,0041	±	0,0028
bta-miR-411c-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-411c-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-412	.	±	.	.	±	.	0,0023	±	0,0015
bta-miR-421	0,0070	±	0,0064	0,0067	±	0,0021	0,1600	±	0,1417
bta-miR-423-3p	0,0029	±	0,0023	0,0036	±	0,0030	0,0216	±	0,0044
bta-miR-423-5p	0,0100	±	0,0034	0,0126	±	0,0044	0,0031	±	0,0010
bta-miR-424-3p	.	±	.	0,0007	±	0,0003	0,0135	±	0,0046
bta-miR-424-5p	.	±	.	0,0010	±	0,0012	0,0239	±	0,0151
bta-miR-425-3p	0,0827	±	0,0364	.	±	.	14,1388	±	5,8179
bta-miR-425-5p	1,1448	±	0,3236	1,2706	±	0,2768	0,0051	±	0,0006
bta-miR-429	0,0144	±	0,0073	0,0109	±	0,0036	0,0388	±	0,0065
bta-miR-431	0,0026	±	0,0014	0,0027	±	0,0019	0,0149	±	0,0038
bta-miR-432	0,0029	±	0,0015	0,0008	±	0,0008	0,0796	±	0,0897
bta-miR-433	0,0099	±	0,0026	0,0081	±	0,0053	0,1321	±	0,0795
bta-miR-448	.	±	.	0,0001	±	0,0000	0,0028	±	0,0008
bta-miR-449a	0,3221	±	0,3608	0,2782	±	0,3492	0,0034	±	0,0012
bta-miR-449b	0,0206	±	0,0301	0,0301	±	0,0446	0,0101	±	0,0078
bta-miR-449c	.	±	.	.	±	.	0,0181	±	0,0242
bta-miR-449d	0,0132	±	0,0058	0,0108	±	0,0074	0,0335	±	0,0128
bta-miR-450a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-450b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-451	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-452	0,0013	±	0,0012	0,0002	±	0,0000	0,0328	±	0,0395
bta-miR-4523	0,0113	±	0,0053	0,0088	±	0,0035	0,0115	±	0,0047
bta-miR-453	0,0069	±	0,0001	0,0039	±	0,0005	0,0046	±	0,0035
bta-miR-454	.	±	.	.	±	.	0,0457	±	0,0539
bta-miR-455-3p	.	±	.	.	±	.	0,0085	±	0,0061
bta-miR-455-5p	.	±	.	0,0011	±	0,0013	0,0716	±	0,0709
bta-miR-483	.	±	.	0,0010	±	0,0008	0,0061	±	0,0033
bta-miR-484	0,0007	±	0,0007	0,0012	±	0,0010	0,0332	±	0,0101
bta-miR-485	0,0005	±	0,0002	0,0004	±	0,0004	0,0082	±	0,0103
bta-miR-486	0,0694	±	0,0216	0,0555	±	0,0103	0,1009	±	0,0403
bta-miR-487a	.	±	.	.	±	.	0,0021	±	0,0008
bta-miR-487b	0,0012	±	0,0008	0,0006	±	0,0006	0,0027	±	0,0023
bta-miR-488	.	±	.	0,0008	±	0,0004	0,1997	±	0,1782
bta-miR-489	0,0016	±	0,0011	0,0010	±	0,0004	0,0482	±	0,0301
bta-miR-490	0,0039	±	0,0007	0,0047	±	0,0028	0,0339	±	0,0150

bta-miR-491	0,0012	±	0,0007	0,0029	±	0,0037	0,0221	±	0,0168
bta-miR-493	0,0106	±	0,0053	0,0105	±	0,0037	0,0527	±	0,0298
bta-miR-494	1,3068	±	0,7157	2,2816	±	1,0446	10,5780	±	3,0809
bta-miR-495	0,0022	±	0,0009	.	±	.	.	±	.
bta-miR-496	.	±	.	.	±	.	0,0978	±	0,0761
bta-miR-497	0,0097	±	0,0084	0,0113	±	0,0112	0,0055	±	0,0041
bta-miR-499	.	±	.	0,0007	±	0,0005	.	±	.
bta-miR-500	0,0011	±	0,0002	0,0008	±	0,0001	0,1472	±	0,0597
bta-miR-502a	.	±	.	0,0005	±	0,0003	0,0033	±	0,0031
bta-miR-502b	0,0023	±	0,0001	.	±	.	0,0378	±	0,0310
bta-miR-503-3p	0,0199	±	0,0085	0,0115	±	0,0028	0,2895	±	0,1169
bta-miR-503-5p	.	±	.	0,0004	±	0,0002	0,0414	±	0,0183
bta-miR-504	0,0027	±	0,0024	0,0033	±	0,0008	0,0994	±	0,0753
bta-miR-505	0,0033	±	0,0001	0,0009	±	0,0003	0,0320	±	0,0253
bta-miR-532	0,0139	±	0,0207	0,0002	±	0,0002	0,0095	±	0,0027
bta-miR-539	.	±	.	.	±	.	0,0014	±	0,0016
bta-miR-541	0,0150	±	0,0027	0,0141	±	0,0050	0,1668	±	0,0058
bta-miR-542-5p	0,0110	±	0,0059	0,0034	±	0,0017	0,0005	±	0,0002
bta-miR-543	.	±	.	0,0021	±	0,0001	0,0046	±	0,0038
bta-miR-544a	.	±	.	.	±	.	0,0100	±	0,0129
bta-miR-544b	.	±	.	.	±	.	0,0132	±	0,0056
bta-miR-545-3p	0,0012	±	0,0004	0,0025	±	.	.	±	.
bta-miR-545-5p	0,0024	±	0,0012	0,0007	±	0,0003	.	±	.
bta-miR-551a	.	±	.	.	±	.	0,0043	±	0,0038
bta-miR-551b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-562	.	±	.	.	±	.	0,0042	±	0,0010
bta-miR-568	.	±	.	.	±	.	0,0020	±	0,0017
bta-miR-574	0,1758	±	0,0904	0,1467	±	0,0745	1,8761	±	0,5947
bta-miR-582	.	±	.	.	±	.	0,1427	±	0,0503
bta-miR-584	0,0031	±	0,0017	0,0031	±	0,0017	0,0298	±	0,0138
bta-miR-592	.	±	.	.	±	.	0,0020	±	0,0002
bta-miR-599	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-615	.	±	.	.	±	.	40790,7953	±	2884,1670
bta-miR-628	.	±	.	.	±	.	0,0363	±	0,0567
bta-miR-631	29,1166	±	16,7781	13,9559	±	3,3240	86,5707	±	17,6398
bta-miR-652	.	±	.	.	±	.	0,0110	±	0,0048
bta-miR-653	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-654	0,0025	±	0,0002	0,0026	±	0,0037	0,0218	±	0,0137
bta-miR-655	0,0004	±	0,0003	.	±	.	0,0054	±	0,0044
bta-miR-656	0,0030	±	0,0006	0,0059	±	0,0075	0,0232	±	0,0123
bta-miR-658	0,0019	±	0,0018	0,0011	±	0,0007	0,0024	±	0,0009
bta-miR-660	0,0076	±	0,0010	0,0089	±	0,0055	0,0347	±	0,0334
bta-miR-664a	0,0113	±	0,0042	0,0186	±	0,0155	0,0312	±	0,0099
bta-miR-664b	0,0277	±	0,0202	0,0274	±	0,0151	0,0520	±	0,0315
bta-miR-665	0,0852	±	0,0075	0,0491	±	0,0148	1,8669	±	0,5909

bta-miR-669	0,0136	±	0,0064	0,0152	±	0,0086	0,2193	±	0,0717
bta-miR-670	.	±	.	0,0012	±	0,0006	.	±	.
bta-miR-671	.	±	.	0,0005	±	0,0000	0,0005	±	0,0002
bta-miR-677	0,0036	±	0,0029	0,0011	±	0,0002	0,0120	±	0,0074
bta-miR-7	0,0403	±	0,0391	0,0234	±	0,0192	0,0049	±	0,0012
bta-miR-708	0,0009	±	0,0002	0,0007	±	0,0004	0,0137	±	0,0096
bta-miR-744	0,0005	±	0,0001	0,0011	±	0,0007	0,0034	±	0,0011
bta-miR-758	.	±	.	.	±	.	0,1031	±	0,0769
bta-miR-759	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-760-3p	0,0084	±	0,0033	0,0064	±	0,0049	0,0605	±	0,0178
bta-miR-760-5p	0,1440	±	0,1134	0,2701	±	0,2594	0,2879	±	0,0473
bta-miR-761	0,0017	±	0,0005	0,0017	±	0,0015	0,0019	±	0,0020
bta-miR-763	0,0047	±	0,0032	0,0170	±	0,0118	0,0537	±	0,0226
bta-miR-764	0,0296	±	0,0388	0,0177	±	0,0243	0,0095	±	0,0053
bta-miR-767	0,0068	±	0,0045	0,0056	±	0,0016	0,0156	±	0,0003
bta-miR-769	0,0010	±	0,0003	0,0007	±	0,0006	0,0265	±	0,0138
bta-miR-873	0,0009	±	0,0012	0,0003	±	0,0003	0,0258	±	0,0200
bta-miR-874	0,0227	±	0,0104	.	±	.	0,0836	±	0,0124
bta-miR-875	.	±	.	.	±	.	0,0028	±	0,0014
bta-miR-876	.	±	.	.	±	.	0,4186	±	0,3493
bta-miR-877	0,0348	±	0,0057	0,0213	±	0,0024	0,1232	±	0,0367
bta-miR-885	0,0025	±	0,0026	0,0031	±	0,0020	0,0446	±	0,0129
bta-miR-92a	0,0264	±	0,0112	0,0332	±	0,0128	0,0624	±	0,0259
bta-miR-92b	0,0906	±	0,0335	0,0621	±	0,0093	9,8715	±	2,7442
bta-miR-93	0,6598	±	0,5074	0,8192	±	0,6432	0,0103	±	0,0007
bta-miR-935	0,0072	±	0,0025	0,0080	±	0,0044	0,2452	±	0,0586
bta-miR-9-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-940	0,9009	±	0,3382	0,7745	±	0,1527	32,4275	±	12,2599
bta-miR-95	0,0026	±	0,0011	0,0041	±	0,0043	.	±	.
bta-miR-9-5p	0,0225	±	0,0145	0,0211	±	0,0146	0,0100	±	0,0074
bta-miR-96	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-98	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-99a-3p	.	±	.	.	±	.	0,0049	±	0,0021
bta-miR-99a-5p	1,0856	±	0,7910	1,7422	±	1,0775	0,0043	±	0,0037
bta-miR-99b	0,9146	±	0,3110	0,7662	±	0,2567	4,4615	±	0,8911
bta-miR-99b	0,9223	±	0,2811	0,8128	±	0,2058	5,7071	±	0,4555
Hm/Ms/Rt T1									
snRNA	0,9175	±	0,2472	1,6149	±	0,5084	53,6440	±	17,0054
RNT43 snoRNA	0,0041	±	0,0025	0,0045	±	0,0006	0,1462	±	0,0139

Fonte: Alves (2018).