



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs
ESPERMÁTICOS ASSOCIADO A TAXAS DE PRENHEZ E
PERDA GESTACIONAL EM IATF**

JUAN CUEVAS DE ALVARENGA MARTINS

**Campo Grande – MS
2025**

JUAN CUEVAS DE ALVARENGA MARTINS

**EVALUATION OF SPERM microRNAs ASSOCIATED WITH
PREGNANCY AND PREGNANCY LOSS ON FTAI**

Juan Cuevas de Alvarenga Martins

Orientador: Prof. Dr. Eriklis Nogueira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito final para a obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Veterinárias.

**Campo Grande – MS
2025**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MESTRADO

Aos dezessete dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e cinco, às catorze horas, via *on line*, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Ériklis Nogueira (EMBRAPA), Eliane Vianna da Costa e Silva (UFMS) e William Borges Domingues (UFPEL), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **JUAN CUEVAS DE ALVARENGA MARTINS**, CPF ***.230.248-**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Avaliação de MicroRNAs espermáticos como biomarcadores de fertilidade de touros**" e orientação de Ériklis Nogueira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer exposto conforme segue:

EXAMINADOR	AValiação
Dr. Ériklis Nogueira (Presidente)	(APROVADO)
Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva (Interno)	(APROVADO)
Dr. William Borges Domingues (Externo)	(APROVADO)

RESULTADO FINAL:
() Aprovação (X) Aprovação com revisão () Reprovação

Assinatura

NOTA MÁXIMA NO MEC	UFMS É 10!!!		Documento assinado eletronicamente por Juan Cuevas de Alvarenga Martins , Usuário Externo, em 15/08/2025, às 07:41, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
NOTA MÁXIMA NO MEC	UFMS É 10!!!		Documento assinado eletronicamente por William Borges Domingues , Usuário Externo, em 15/08/2025, às 11:24, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
NOTA MÁXIMA NO MEC	UFMS É 10!!!		Documento assinado eletronicamente por Eliane Vianna da Costa e Silva , Professora do Magistério Superior, em 15/08/2025, às 13:47, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
NOTA MÁXIMA NO MEC	UFMS É 10!!!		Documento assinado eletronicamente por Eriklis Nogueira , Usuário Externo, em 18/08/2025, às 15:16, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

RESUMO

MARTINS, J C A. Avaliação da expressão de microRNAs espermáticos associados a taxas de prenhez e perda gestacional em IATF. Mestre - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2025.

A crescente demanda por proteína animal destaca a importância de identificar precocemente bovinos com alto potencial genético. Essa identificação favorece o melhoramento reprodutivo e produtivo dos rebanhos. Além disso, permite a comercialização global de sêmen com características de alto valor econômico. Marcadores moleculares reprodutivos têm alto valor comercial por permitirem diagnóstico precoce e validação do potencial genético. Seu uso impulsiona o mercado internacional de genética animal e inseminação artificial. MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA que regulam a expressão gênica. Os miRNAs presentes no espermatozoide podem ajudar a identificar causas de subfertilidade ou infertilidade idiopática, por meio da técnica de qPCR. Esses miRNAs atuam na regulação gênica e estão diretamente ligados à qualidade reprodutiva. Devido a esse papel, são considerados biomarcadores promissores de fertilidade. Podem ser úteis no diagnóstico reprodutivo tanto em animais quanto em humanos. O presente estudo buscou avaliar mudanças na expressão de miRNAs associados com taxas de prenhez por inseminação (P/IA) e perda gestacional de touros usados em inseminação artificial em tempo-fixado (IATF), com dados a campo. No total, 29 touros foram selecionados de um banco de dados baseados na sua performance de fertilidade a campo, agrupados de acordo com as 10% maiores e menores taxas de prenhez e perda gestacional. O RNA total foi extraído de doses criopreservadas de sêmen seguindo protocolo registrado no INPI, concentração e qualidade do RNA extraído foi avaliado via espectrofotometria. Do RNA total extraído, foi sintetizado cDNA usando o kit comercial TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis para realização dos ensaios de qPCR utilizando sondas TaqMan™ específicas para os microRNAs miR-7, -204, -139 e -191. As amostras foram analisadas em duplicata para obter Ct médio de cada amostra. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi usado para avaliar as mudanças na expressão dos miRNAs, sendo a diferença estatística entre os grupos avaliada através de teste-t para grupos individuais e análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste de tukey pós-hoc para grupos conjuntos, com nível de significância de $p < 0,05$. O miR-7 apresentou um aumento de expressão em amostras de baixa P/IA quando comparado com alta P/IA, sem influência da perda gestacional, enquanto o miR-204 apresentou uma tendência ($p = 0,08$) no aumento da expressão em amostras de alta perda gestacional, se tornando mais evidente em amostras de baixa P/IA ($p < 0,05$). Já o miR-191 apresentou diferença na expressão de dois grupos de interesse comercial, sendo eles alta fertilidade (alta P/IA e baixa perda gestacional) e baixa fertilidade (baixa P/IA e alta perda gestacional). Os miRNAs associados a fertilidade masculina estão sendo investigados, como neste estudo, devido ao potencial como preditores da capacidade reprodutiva masculina, algo de grande interesse comercial para o desenvolvimento de biotecnologias.

Palavras-chave: Fertilidade, perdas embrionárias, sêmen criopreservado, tecnologia de sêmen.

ABSTRACT

MARTINS, J C A. Evaluation of sperm microRNAs associated with pregnancy and pregnancy loss on FTAI. Master - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

The growing demand for animal protein underscores the importance of early identification of bulls with high genetic potential. Such identification promotes reproductive and productive improvement of herds and enables the global commercialization of semen with high economic value traits. Reproductive molecular markers have high commercial value as they allow early diagnosis and validation of genetic potential. Their use drives the international market for animal genetics and artificial insemination. MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that regulate gene expression. Spermatozoa-derived miRNAs can help identify causes of subfertility or idiopathic infertility through qPCR analysis. These miRNAs regulate gene expression and are directly linked to reproductive quality. Due to this role, they are considered promising fertility biomarkers and may be useful for reproductive diagnosis in both animals and humans. This study aimed to evaluate changes in the expression of miRNAs associated with pregnancy per insemination (P/AI) rates and gestational loss in bulls used in fixed-time artificial insemination (FTAI), based on field data. A total of 29 bulls were selected from a database according to their field fertility performance, grouped by the highest and lowest 10% pregnancy and gestational loss rates. Total RNA was extracted from cryopreserved semen doses following a protocol registered with the INPI. RNA concentration and quality were assessed via spectrophotometry. From the extracted total RNA, cDNA was synthesized using the TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, and qPCR assays were performed with TaqMan™ probes specific for miR-7, -204, -139, and -191. Samples were analyzed in duplicate to obtain the mean Ct for each sample. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was applied to assess changes in miRNA expression, with statistical differences between groups evaluated by t-test for individual groups and one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for combined groups, with significance set at $p < 0.05$. miR-7 showed increased expression in low P/AI samples compared to high P/AI, without influence from gestational loss, whereas miR-204 showed a trend ($p = 0.08$) toward higher expression in high gestational loss samples, becoming significant in low P/AI samples ($p < 0.05$). miR-191 differed in expression between two commercially relevant groups: high fertility (high P/AI and low gestational loss) and low fertility (low P/AI and high gestational loss). Male fertility-associated miRNAs are being investigated, as in this study, for their potential as predictors of male reproductive capacity, which holds great commercial interest for the development of biotechnologies.

Keywords: *cryopreserved semen, embryo loss, fertility, semen technology.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre a taxa de prenhez a campo e a estimada para todos os touros	20
Figura 2. Relação entre confiabilidade e Número de inseminações de IATF.	21
Figura 3. Diferença de expressão dos miRNAs em comparações de categorias individuais (prenhez ou perda).	22
Figura 4. Diferença de expressão dos miRNAs entre grupos conjuntos.	23

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
Abstract.....	5
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	27
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	27
9. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO	28
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE ABREVIATURAS

P/IA: Taxa de concepção

PRa: Grupo de alta taxa de prenhez por inseminação artificial

PRb: Grupo de baixa taxa de prenhez por inseminação artificial

PGa: Grupo de alta taxa de perda gestacional

PRb: Grupo de baixa taxa de perda gestacional

1. INTRODUÇÃO

Desde a adoção dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável pela ONU em 2015, houve um foco intensificado na erradicação da fome e na melhoria da nutrição global. Assim, o sistema produtivo precisa evoluir para se tornar mais nutritivo, inclusivo e ambientalmente sustentável. Com a crescente demanda global por proteína animal e a significativa importância econômica da bovinocultura no Brasil e em outros países, é crucial o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a identificação precisa de animais com potencial genético para aprimorar a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos. A identificação precisa e precoce destes animais permite sua inclusão em programas de melhoramento e a comercialização de sêmen em nível mundial, promovendo assim a disseminação de características produtivas de alto valor econômico como a produção diária de leite, peso da carcaça e fertilidade.

Touros demandam gastos de manutenção durante sua utilização, o que torna animais subfêrteis ou infêrteis, enquanto não diagnosticados e removidos do rebanho, causadores de prejuízos na otimização dos recursos na produção animal. A fertilidade do touro impacta diretamente no resultado, pois estes acasalam com diversas fêmeas durante a estação de monta. A utilização de técnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) auxilia na produtividade quando touros que foram identificados como geneticamente superiores são utilizados. Consistindo na sincronização do desenvolvimento folicular através da aplicação de hormônios, permite a reprodução sem a necessidade de detecção de cio (BÓ; BARUSELLI, 2014). Além disso, a prática da IATF permite a criação de uma estação reprodutiva concentrada através de inseminações e ressincronizações, gerando lotes mais uniformes e é capaz de atingir altas taxas de concepção, sem a necessidade de monta natural (BÓ et al., 2018). Apesar de uma técnica antiga, se tornou bem aceita na produção animal e continua apresentando aprimoramentos (MONTEIRO et al., 2023). No entanto, é importante ressaltar que a qualidade do sêmen a ser utilizado é um dos fatores com grande influência nas taxas de prenhez e perda gestacional, merecendo maior atenção (SILVA et al., 2023).

O potencial reprodutivo de animais de produção é diagnosticado através da análise de diferentes variáveis, desde a etapa de fertilização até o parto, e a capacidade de prever a fertilidade através da avaliação espermática ainda é limitada devido a quantidade de fatores que estão ligados ao potencial reprodutivo (ROSÁRIA et al., 2009). Mesmo dentre as partidas de sêmen que se encontram dentre os parâmetros aceitáveis de morfologia e motilidade, os machos podem apresentar deficiência no potencial de fertilidade a campo (BARBOSA et al., 2005). No Brasil, no ano de 2024, 20,46% das matrizes foram inseminadas, e o número de doses coletadas em centrais chegou a 17,3 milhões para gado de corte e 3,1 milhões para gado leiteiro. além disso, é importante destacar que a inseminação artificial é utilizada em 70,6% dos municípios para gado leiteiro e 71,58% para gado de corte (ASBIA, 2024). Entre 2004 e 2024 o rebanho bovino no Brasil cresceu 11%, totalizando aproximadamente 194 milhões de cabeças no país (Abiec, 2025). Desta forma, é possível observar que a utilização de sêmen aprovado em protocolos de avaliação de fertilidade juntamente a programas de inseminação artificial apresenta importantes benefícios frente a outras possíveis técnicas ou utilizações. A inseminação artificial permite o uso difundido de touros geneticamente superiores, o que leva a um aprimoramento em características produtivas e reprodutivas, além de reduzir o risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, também reduz os custos para manter touros no rebanho e permite a concentração de gastos durante uma estação de monta fixa (MOROTTI et al., 2021)

As perdas gestacionais representam um grande desafio para a eficiência reprodutiva. Essas perdas podem ocorrer em diferentes fases, desde a fecundação até o final da gestação. Condições ambientais, nutricionais e de manejo inadequado contribuem significativamente para a ocorrência de perdas gestacionais. Além disso, diversos fatores são oriundos do touro e do genoma paterno, influenciando o desenvolvimento placentário e perdas gestacionais (POHLER; OLIVEIRA FILHO, 2024).

Devido ao potencial de diagnóstico em tempo hábil e validação do potencial do animal, marcadores moleculares voltados a reprodução de ruminantes possuem um grande mercado internacional, devido ao aumento do valor

comercial do produto oferecido por empresas voltadas a genética animal e inseminação artificial (THUNDATHIL et al., 2016).

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de RNA não codificantes de aproximadamente 18-22 nucleotídeos, envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Eles atuam através da junção com um complexo multienzimático na degradação ou bloqueio da tradução do RNA mensageiro (mRNA), podendo cada microRNA ter mais de 100 genes alvos (FARIAS CAMPOS et al., 2011). Os microRNAs estão envolvidos em importantes processos biológicos incluindo diferenciação celular, apoptose, embriogênese e espermatogênese, entre outros (GROSS et al., 2017; KOTAJA et al., 2014). Os microRNAs presentes no esperma podem prever fatores responsáveis pela subfertilidade ou infertilidade idiopática, dos quais são possíveis de identificar através da técnica de qPCR (DOMINGUES et al., 2020, 2021). Devido ao seu papel fundamental, miRNAs espermáticos são potenciais biomarcadores do potencial reprodutivo e podem se tornar mais uma ferramenta no diagnóstico de subfertilidade e infertilidade idiopática em animais e também em humanos (ALVES et al., 2020).

O desenvolvimento de uma tecnologia que utilize miRNAs como biomarcadores do potencial reprodutivo, tanto na venda de touros como na de sêmen utilizados em rotinas de inseminação artificial é de extremo interesse comercial. A agregação destes dados em análises tem o potencial de aumentar a precisão e confiabilidade de diagnósticos e previsões relacionadas ao potencial reprodutivo. O possível impacto se torna mais evidente quando são analisados diferentes lados da cadeia produtiva, como a redução de custos devido a melhor escolha dos animais utilizados e remoção de animais com menor potencial reprodutivo, otimizando a produção, e o melhoramento genético das próximas gerações com a utilização de animais com a presença de miRNAs relacionados intimamente com alta fertilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de RNA não codificantes de aproximadamente 18-22 nucleotídeos. Os miRNAs são transcritos pela RNA

polimerase II ou III, resultando em um miRNA primário (pri-miRNA). Em seguida, os pri-miRNAs passam por processamento em um complexo nuclear que inclui a enzima Drosha (LEE et al., 2003), e outras proteínas acessórias, que resulta em um miRNA precursor (pre-miRNA). Em seguida são transportados para o citoplasma através da Exportina 5, onde são processados por um complexo enzimático que inclui a Dicer e componentes complementares, originando um duplex de miRNA com aproximadamente 22 nucleotídeos, uma das duas fitas de miRNA associa-se a uma proteína Argonauta e se acopla ao RISC (RNA-Induced silencing complex), que reprime a expressão do RNA mensageiro (mRNA) alvo (GREGORY et al., 2005). Estão envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica (MOKÁNSZKI et al., 2020). Eles atuam através da junção com um complexo multienzimático na degradação ou bloqueio da tradução do RNA mensageiro (mRNA), podendo cada miRNA ter mais de 100 genes alvos (FARIAS CAMPOS et al., 2011). Fazendo com que miRNAs estejam envolvidos em importantes processos biológicos incluindo diferenciação celular, apoptose, embriogênese e espermatogênese, entre outros (GROSS et al., 2017; KOTAJA et al., 2014). Os miRNAs possuem um alto grau de conservação entre as espécies (PERGE et al., 2017; ZHANG et al., 2018), o que facilita na busca de miRNAs com potencial de biomarcadores relacionados a fertilidade de machos mesmo entre diferentes espécies. Estima-se que mais de 30% dos genes codificadores de proteínas sejam regulados por miRNAs (WYNSBERGHE et al., 2011).

MiRNAs presentes no esperma podem prever fatores responsáveis pela subfertilidade ou infertilidade idiopática, dos quais são possíveis de identificar através da técnica de qPCR (DOMINGUES et al., 2020, 2021). Segundo Corralvazquez et al (2019), duplas de miRNAs possuem potencial como biomarcadores de fertilidade masculina, como é o caso dos pares hsa-miR-942-5p/hsa-miR-1208 para astenozoospermia, hsa-miR-296-5p/hsa-miR-328-3p para teratozoospermia, hsa-miR-139-5p/hsa-miR-1260a para oligozoospermia e hsa-miR-34b-3p/hsa-miR-93-3p para infertilidade masculina inexplicada (UMI). O miRNA let-7c em sêmen de javali demonstrou ser um dos mais estáveis, participando de processos envolvidos na criopreservação (ZHANG et al., 2015), possuindo potencial para ser utilizado como normalizador em análises de qPCR.

Diversos estudos relacionando a expressão de miRNAs com fertilidade de touros foram desenvolvidos, incluindo o estudo desenvolvido por De Souza et al (2024), que realizaram uma revisão sistemática da literature. Estes autores descrevem 182 miRNAs identificados diferencialmente expressos, dos quais 49 foram encontrados em comum em dois ou mais trabalhos, destes 49 foram destacados os miRNAs miR-10a, -10b, -103, -15b, -122, -125b, -126-5p, -151-5p, -193a-5p, -196a, -27a-5p e -99b como potenciais biomarcadores para avaliação do potencial reprodutivo de machos.

Já Fagerlind et al (2015) encontraram sete microRNAs diferencialmente expressos quando comparado touros de alta fertilidade com os de moderada e baixa fertilidade. Enquanto Capra et al (2017) identificaram 83 microRNAs diferencialmente expressos ao investigar em amostras de sêmen bovino congelado com diferentes perfis de motilidade e cinética espermática, dos quais 19 já haviam sido previamente relatados como diferencialmente expressos em espermatozoides com anormalidades em outras espécies (humanos, bovinos e ovinos). Utilizando como parâmetro de comparação a taxa de concepção dos touros foram encontrados com a expressão reduzida os miRNAs bta-mir-182, bta-let-7b, bta-mir-34c e bta-mir-20a no sêmen de qualidade inferior (SINGH et al., 2023). Ainda, Kasimanikan et al (2022) relataram 32 microRNAs diferencialmente expressos no esperma e plasma seminal de touros Holstein com alta e baixa fertilidade, sendo 20 supra-regulados e 12 infra-regulados.

Yuan et al (2015) relataram que o miR-34b/c e miR-449a/b/c são necessários para a espermatogênese em ratos, porém não impactam na fertilização e desenvolvimento embrionário. Além disso, os mesmos pesquisadores relataram em 2019 que os miR-34b/c e miR-449a/b/c são necessários no sistema reprodutivo masculino para o desenvolvimento e funcionamento para gerar turbulência luminal, o qual é essencial para o transporte de espermatozoides imaturos, remoção de resíduos, manutenção do microambiente, sinalização mecânica, ativação celular e prevenção da estase intratubular. Porém houve relatos que o miR-34c proveniente de vesículas extracelulares derivadas do fluido folicular modula a qualidade de blastocistos, enquanto a suplementação não afetou desenvolvimento embrionário durante maturação in-vitro, porém aumentou o número de células do blastocisto

(BENEDETTI et al., 2024). Mais recentemente foi relatado que os miRNAs miR-149, miR-34c, miR-449b-5p, hsa-mir-191, miR-19b-3p, miR-let-7a-5p, miR-140, miR-21 e miR-375, são possíveis indicadores da qualidade embrionária e dos resultados de prenhez utilizando técnicas de reprodução assistida (SHI et al., 2024)

A expressão de miRNAs também é regulada através de mecanismos epigenéticos como a metilação de DNA e modificação de RNA e podem agir como moduladores epigenéticos para afetar os níveis de proteína geradas a partir da tradução dos mRNAs alvo, sem que ocorra a modificação da sequência gênica (YAO et al., 2019). Foram observadas mudanças nos níveis de expressão dos miRNAs baseados em influências externas, tais como a exposição a estresse e experiências adversas no início da vida de humanos e ratos (DICKSON et al., 2018), e o estresse térmico testicular afetando os níveis de expressão de diversos miRNAs presentes nas vesículas extracelulares (ALVES et al., 2021).

Homens com azoospermia apresentaram 197, 68 e 46 miRNAs diferencialmente expressos em amostras dos grupos de (causa da azoospermia) apenas célula de Sertoli, atrofia mista e parada do ciclo de células germinativas, respectivamente, quando comparadas com o grupo de espermatogênese normal, sendo cinco deles (hsa-mir-34b, hsa-mir-34b, hsa-mir-34c-5p, hsa-mir-449a e hsa-mir-449) envolvidos em apoptose, proliferação celular e diferenciação (ABU-HALIMA et al., 2014). Há uma diferença no nível de expressão dos miRNAs no plasma seminal de coelhos férteis em relação a subférteis (SAKR et al., 2023), assim como no sobrenadante de amostras de homens com azoospermia em relação a normozoospermia (WAINSTEIN et al., 2023). Foi observado aumento significativo dos miR-141, miR-429 e miR-7-1-3p no plasma seminal de pacientes com azoospermia não obstrutiva (WU et al., 2013). O miR-7-1-3p e, em alguns casos, as variantes let-7a, let-7b e let-7c se encontraram significativamente aumentados em espermatozoides e plasma seminal de homens com infertilidade, oligozoospermia, astenozoospermia e azoospermia não obstrutiva segundo Mokánszki et al (2019), relataram correlação negativa entre a concentração espermática e os níveis de expressão de miR-7-1-3p. Parceiros de mulheres com perda recorrente de gravidez idiopática apresentaram 12 miRNA diferencialmente expressos em relação ao grupo controle (THAPLIYAL et al., 2024). Xu e

colaboradores (2020) relataram a ligação entre os níveis de hsa-miR-191-5p no esperma com o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário.

Entre os genes alvo previstos e confirmados do miR-7-1-3p estão PIK3R3 e RB1, os quais foram demonstrados serem regulados negativamente (Wu et al., 2013). PIK3R3 é expresso precocemente durante o desenvolvimento e permanece abundante em tecidos cerebrais e testiculares adultos (Pons et al., 1995). RB1, um supressor de tumor, está envolvido na regulação da progressão do ciclo celular, replicação de DNA e diferenciação terminal, podendo influenciar a espermatogênese (TAN et al., 2005). Esses genes alvo são expressos no testículo e têm sido sugeridos por desempenhar um papel crítico no processo apoptótico de células germinativas, indicando que o miR-7 pode estar envolvido na patogênese da infertilidade através da via da apoptose (KONRAD et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Em veados sika, o miR-7, quando supra-regulado, inibe a expressão de genes alvo como HIF1A e CSF1, o que foi especulado para promover a espermatogênese (JIA et al., 2022). Em híbridos gado-yak, uma espécie infértil, o bta-miR-7 foi consistentemente infra-regulado e seus genes alvo, como FANCA, MYRFL, INSL3 e USP9X, podem desempenhar um papel crucial no processo reprodutivo e na infertilidade masculina (ZHAO et al., 2022). Segundo Etezadi et al (2024), no contexto da azoospermia, o miR-7 interage diretamente com o Linc00513, uma longa RNA não codificante (lncRNA), do qual atua como um ceRNA (RNA endógeno competitivo) para o miR-7, o que significa que ele "esponja" o miR-7, inibindo sua ação repressora sobre seus próprios alvos, em pacientes azoospermicos. A expressão de Linc00513 é significativamente menor, enquanto a expressão de miR-7 está aumentada. A diminuição de Linc00513 (que é característica da azoospermia) leva a uma redução da repressão de TGFBR1 (TGF- β receptor 1) pelo miR-7, resultando em um aumento da sinalização de TGF- β nos testículos azoospermicos, essa alteração na via de sinalização de TGF- β é um fator importante na patogênese da azoospermia, com o silenciamento de Linc00513 promovendo proliferação celular e diminuindo a apoptose.

O hsa-mir-191-5p está significativamente correlacionado com a morfologia normal do esperma e tem como alvo o gene SOX4, que é uma via de sinalização crucial na oncogênese, a interação entre hsa-mir-191-5p e SOX4 pode

desempenhar um papel importante no desenvolvimento embrionário inicial (XU et al., 2020). Estudos realizados por Grinchuk et al (2010) têm mostrado uma relação de coexpressão significativa entre hsa-mir-191, hsa-mir-425, DALRD3 e NDUFAF3 na espermatogênese em indivíduos normais. Segundo Cassuto et al (2025), o miR-191 interage com genes implicados na regulação da morte celular programada e no estresse oxidativo, entre esses genes estão: BCL2L11 (Bim), BCL2L1, CASP3 (Caspase-3), CDKN2A, ERK1/2, BMPR2, SMAD1/5/9, Ciclina E, AKT2, E2F1 e E2F3 (envolvidos no estresse oxidativo), também atua sobre genes que participam da regulação da motilidade do espermatozoide, como FGFR1, FGFR3, MET, IGF1R e SLC12A2.

O miR-204 interage diretamente com a região 3'UTR do gene Sirt1 mimetizando a sua ação, levando à significativa regulação negativa de Sirt1 a nível de mRNA e proteína em células tronco espermatogoniais (SSCs) de bodes, sendo Sirt1 um promotor da proliferação e autorrenovação das SSCs (NIU et al., 2015). O miR-204 bovino (bta-miR-204) possui como alvo o gene TNP1 (proteína nuclear de transição 1), sendo essa uma proteína essencial na espermatogênese e fertilidade masculina, envolvida na reestruturação da cromatina nuclear da espermátide. A presença de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) funcionais na região 3'-UTR do TNP1 (g.442 A.G e g.528 G.A) podem alterar a capacidade de ligação do bta-miR-204 e bta-miR-532, influenciando assim a supressão translacional do TNP1 (ZHANG et al., 2015). Estudos de Zhou et al (2020) revelaram que o bta-miR-204 tem uma abundância significativamente maior em espermatozoides Y de touros, essa diferença sugere um papel potencial do miR-204 na regulação das diferenças sexuais nos espermatozoides e no desenvolvimento embrionário inicial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi comparar a expressão de miRNAs espermáticos no sêmen criopreservado entre touros Nelore selecionados com base em banco de dados de campo de IATF, divididos em grupos de alta e baixa prenhez, e grupos de alta e baixa perda gestacional, ampliando o conhecimento

disponível sobre fertilidade relacionada a microRNAs para a comunidade científica, auxiliando no desenvolvimento de métodos para o diagnóstico molecular de fertilidade e subfertilidade de sêmen criopreservado utilizado em IATF.

3.2. Objetivos gerais

Avaliar a utilização de um banco de dados para integrar dados de campo relacionados a IATF para melhorar a seleção de touros voltados para reprodução, em ambiente de pesquisa. Avaliar a diferença nos níveis de expressão do miR-7, miR-139, miR-191 e miR-204, selecionados com base na literatura para direcionar a busca dos miRNAs avaliados como biomarcador de potencial reprodutivo em IATF. Auxiliar no desenvolvimento de método de diagnóstico de potencial reprodutivo mais preciso em conjunto com rede de pesquisa, utilizando o perfil de expressão de miRNAs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Banco de dados

Um banco de dados de IATF foi gerado em parceria com a EMBRAPA, centrais de coleta e processamento de sêmen e instituições parceiras contendo informações de IATF ($n > 1.000.000$ IATFs), avaliando taxas de prenhez e perda gestacional a campo. O banco de dados conta com informações como localização, raça da matriz, categoria, data da IATF, inseminador, touro, escore de condição corporal, partida do sêmen, protocolo utilizado, dentre outras informações.

Os protocolos consistiram em aplicação de 2ml de benzoato de estradiol Sincrodiol® (Ourofino, Brasil) via intramuscular e introdução de dispositivo intravaginal de progesterona Primer® (Tecnopec, Brasil) no dia 0 (D0), seguido da retirada do dispositivo e aplicação de 2,5ml de prostaglandina Lutalyse® (Zoetis, Brasil) 0,3ml para novilhas precoces ou 0,5ml para outras categorias de cipationato de estradiol E.C.P® (Zoetis, Brasil) e 1ml para novilhas precoces ou 1,5ml para outras categorias de gonadotrofina coriônica equina Novormon® (Zoetis, Brasil) via intramuscular e aplicação de marca sacrocaudal com bastão marcador no dia 8 (D8), no dia 10 (D10) é feito a medição de cio (1 a 3) baseado na marca

sacrocaudal de acordo com Nogueira et al., 2018 e aplicado 1ml de análogo sintético do GnRH Sincroforte® via intramuscular nas novilhas precoces e nos animais que apresentaram escore de cio menor que 3, seguido da inseminação artificial. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após IATF e novamente após 150 dias para perdas gestacionais. Escore de condição corporal observado com diferentes avaliadores e variando de 1 a 5.

Seguindo a técnica de análise de Gibbs (BLUPF90) e de avaliação de fertilidade com dados de campo (MISZTAL et al, 2002), foram classificados touros Nelore de alta e baixa taxa de prenhez à IATF e baixa e alta perda gestacional do dia 30 até o dia 150 pós-IATF, apresentando Confiabilidade (R²) acima de 30%. Os escores de fertilidade dos touros foram determinados usando ASREML (pacote estatístico usado para ajustar modelos lineares mistos usando o método de máxima verossimilhança residual (REML), segundo Berry et al. (2011), com precisões de pelo menos 90%. A fertilidade de cada touro foi calculada com base nas taxas médias de prenhez ou perda com o desvio percentual de suas taxas de concepção ou perdas gestacionais. Vinte e nove touros foram selecionados dentre as 10% maiores e menores taxas de prenhez e perda gestacional para aquisição de doses criopreservadas, dos quais 18 apresentaram alta taxa de P/IA (PRa) e 11 baixa taxa de P/IA (PRb), e 9 apresentaram alta perda gestacional (PGa) e 14 baixa perda gestacional (PGb). Destes 29 touros selecionados, 5 apresentaram PRa + PGb, outros 5 PRa + PGa, 3 com PRb + PGb e por fim 2 com PRb + PGa dentro dos parâmetros estabelecidos na seleção.

Avaliação Seminal

Doses de sêmen criopreservadas de cada touro foram descongeladas a 36°C em banho maria por 30s e em seguida, depositada uma gota do sêmen em lâmina de vidro coberta por lamínula para avaliação subjetiva de motilidade e vigor através de microscopia óptica, sendo outra porção diluída na proporção de 1:8 utilizando EasyBuffer (IMV Technologies, France) para análise computadorizada através do CASA Ceros II e/ou iSperm, seguindo as instruções do fabricante. O restante foi colocado em um tubo tipo eppendorf contendo solução salina tamponada para posterior avaliação morfológica, a qual foi feita através de microscopia óptica utilizando aumento de 1000xx, descrevendo-se as alterações morfológicas de acordo com o CBRA 2013.

Extração e avaliação dos miRNAs espermáticos

A extração e análise dos níveis dos microRNAs espermáticos foram realizadas em parceria com o laboratório de genômica estrutural da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), onde doses, consistindo em uma partida por touro, foram descongeladas a 36°C em banho maria por 30s, em seguida foi depositado uma gota do sêmen em lâmina de vidro coberta por lamínula para avaliação da viabilidade, utilizando uma câmara de Neubauer foi avaliada a concentração espermática, sendo ideal manter uma concentração menor que 100 milhões de espermatozoides para o processo de extração e leitura. Foram extraídos os miRNAs de doses criopreservadas, utilizando uma partida por touro, seguindo protocolo protegido e registrado junto ao INPI seguido da avaliação em relação à concentração e qualidade do RNA no equipamento NanoDrop Lite (ThermoFisher, EUA). A partir do RNA total extraído, foram confeccionadas amostras de cDNA utilizando o kit comercial TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis (ThermoFisher, EUA). Uma vez confeccionadas as amostras, as mesmas foram usadas em reações de qPCR usando o TaqMan Buffer (ThermoFisher, EUA) junto das sondas específicas para miR-7, miR-139, miR-191, miR-204, utilizando o sistema de qPCR QuantStudio3 ThermoFisher. Para a detecção e quantificação dos níveis dos miRNAs alvos, foi utilizado o kit comercial TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, EUA), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. As configurações de termociclagem para a qPCR seguiram inicialmente uma ativação enzimática a 95°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 segundo e anelamento/extensão a 60°C por 20 segundos. Os valores de linha de base e threshold foram automaticamente definidos pelo software QuantStudio Design Analysis. O número de ciclos de PCR necessários para atingir o limiar de fluorescência em cada amostra foi definido como o valor Ct, e cada amostra foi analisada em duplicata para obter um Ct médio para cada amostra. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para avaliar o fold-change dos miRNAs alvos, utilizando o miRNA let-7c como normalizador.

Análise estatística

A motilidade progressiva das doses e a expressão dos miRNAs espermáticos, avaliado através do fold-change médio, dos grupos PRa e PRb,

PGa e PGb foram comparados utilizando o teste-t de student para duas amostras independentes. Para os grupos PRa + PGb, PRa + PGa, PRb + PGa, PRb + PGb adotou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste de Tukey pós-hoc. Todos os dados foram relatados como médias $\pm$ desvio padrão da média, valores de $p > 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

Foi encontrada uma correlação média (60%) entre a taxas estimadas de fertilidade (prenhez a IATF – Figura 1) e as taxas de prenhez observadas a campo, conforme ilustrado na figura 1, demonstrando a importância dos fatores externos na correta identificação de fertilidade de touros utilizados em IATF (NOGUEIRA et al., 2025).

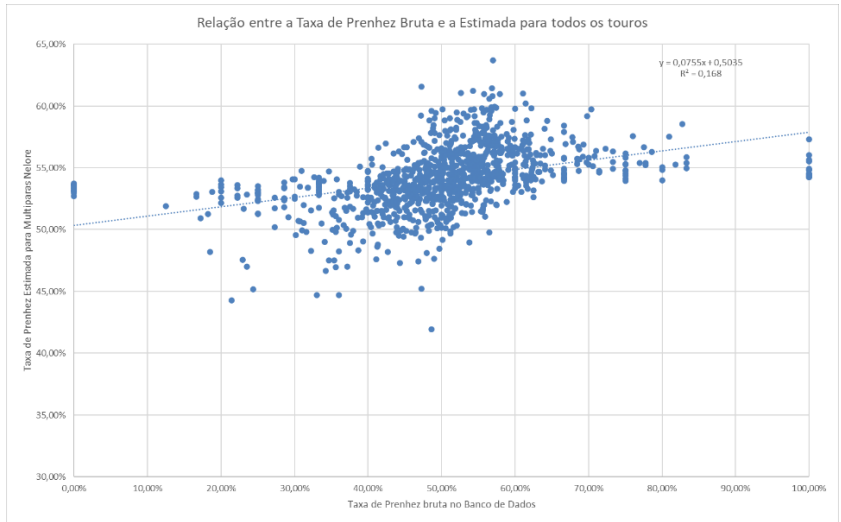


Figura 1 – Relação entre a taxa de prenhez a campo e a estimada para todos os touros obtidas a partir da IATF.

Já na Figura 2, é demonstrada a confiabilidade da estimativa de acordo com o número de inseminações, demonstrando que acima de 80 inseminações já é possível obter valores aceitáveis de confiabilidade (acima de 35%) na estimativa de fertilidade de touros usados em IATF, desde que atendidos os requisitos de utilizar dois ou mais touros no lote, em diferentes categorias, lotes e/ou fazendas diferentes para ser possível a comparação entre reprodutores de forma acurada. Nesses touros Nelore com confiabilidade aceitável, a diferença de P/IA entre o melhor e pior touro foi de 21,8 pontos percentuais.

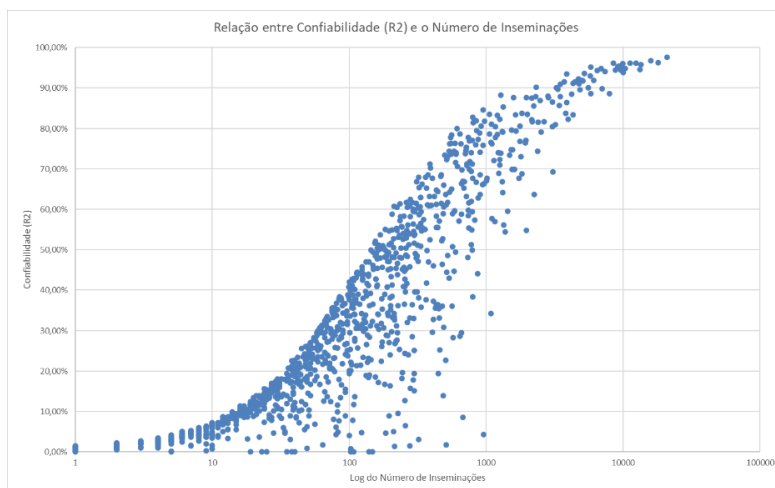


Figura 2- Relação entre confiabilidade e Número de inseminações de IATF.

Esses animais diferem em seu mérito genético médio para perdas gestacionais em 8%, e foi encontrado uma diferença entre os 10% melhores e os 10% touros piores resultando em uma mudança na perda gestacional de novilhas, passando de 14,68% para 10,03%, o que representa uma redução de 31%.

Avaliação seminal

Os touros do grupo PRa apresentaram motilidade total média de $48,86 \pm 10,84\%$, enquanto o grupo PRb apresentou média de $41,68 \pm 13,06$ ($p = 0,71$). Os touros do grupo PGa apresentaram motilidade total média de $42,63 \pm 10,67\%$, enquanto o grupo PGb apresentou média de $52,35 \pm 11,17$ e quando comparados entre si também não apresentaram diferença estatística ($p = 0,89$). A morfologia espermática se encontrava dentro dos parâmetros aceitáveis (Defeitos totais - menor que 30% e abaixo de 20% de defeitos maiores) indicados pelo CBRA. Os touros do grupo PRa apresentaram quantidade total de defeitos média de $16,54 \pm 6,72\%$, enquanto o grupo PRb apresentou média de $13,16 \pm 6,58$ ($p = 0,95$). Os touros do grupo PGa apresentaram quantidade total de defeitos média de $15,75 \pm 5,87\%$, enquanto o grupo PGb apresentou média de $14,57 \pm 6,87$ ($p = 0,86$).

Expressão miRNAs

A partir da extração dos RNAs, foi obtida uma média de 103,68 ng/μl e pureza média (A260/A280) de 1,76 nas amostras. A expressão relativa do miR-7 se encontrou aumentada no grupo PRb quando comparada com o grupo PRa ($p < 0,05$), porém nos grupos PGa e PGb não houve diferença estatística ($p > 0,05$). O miR-204 apresentou uma tendência na diminuição da expressão relativa no grupo de PGa quando comparado com o PGb ($P = 0,08$), não houve diferença

significativa entre PRa e PRb ($p > 0,05$). Os miRNAs miR-139 e miR-191 não apresentaram diferença estatística entre os grupos PRa e PRb, e PGa e PGb ($p > 0,05$). Resultados demonstrados na Figura 3.

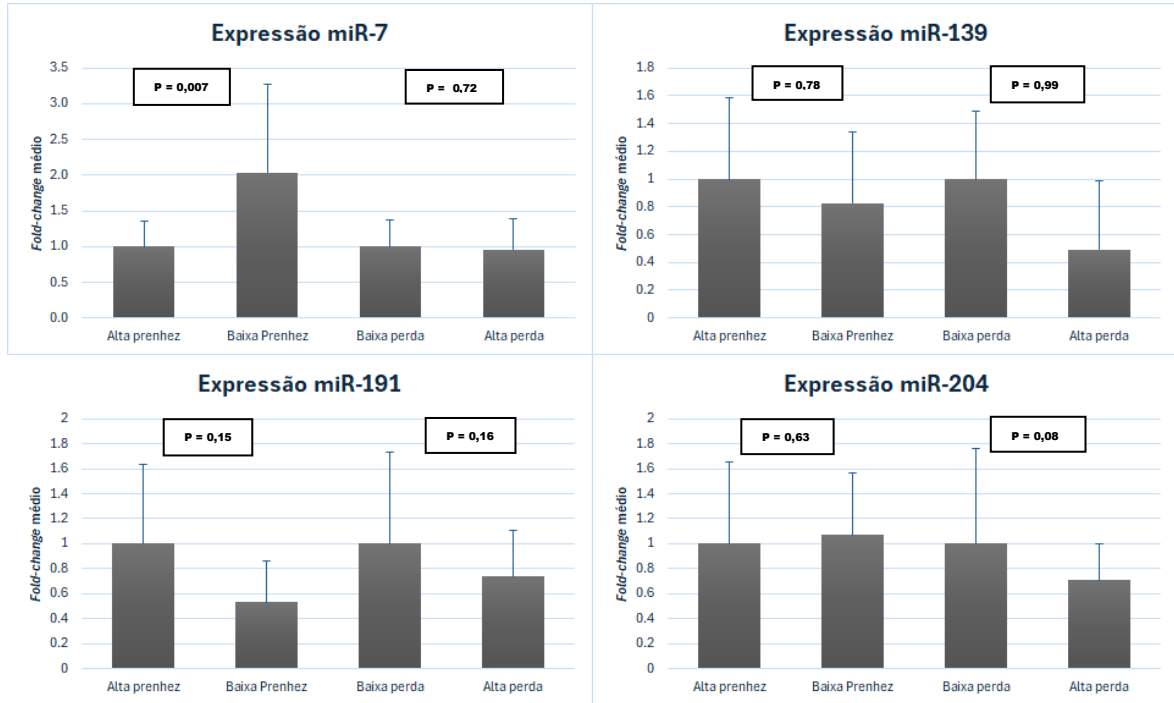


Figura 3 – Diferença de expressão dos miRNAs em comparações de categorias individuais (prenhez ou perda). Para o miR-7, entre taxas de prenhez $p = 0,007$ e entre taxas de perda gestacional $p = 0,72$. Para o miR- 139, entre taxas de prenhez $p = 0,78$, entre taxas de perga gestacional $p = 0,99$. Para o miR-191, entre taxas de prenhez $p = 0,15$, entre taxas de perda gestacional $p = 0,16$. Para o miR-204, entre taxas de prenhez $p = 0,63$, entre taxas de perda gestacional $p = 0,08$.

A análise conjunta dos grupos PRa + PGb, PRa + PGa, PRb + PGa, PRb + PGb demonstrou para o miR-7 apresentou diferença estatística em sua expressão em touros com baixa prenhez em relação aos de alta prenhez, sem interferência das perdas gestacionais. Para o miR-139 houve diferença em sua expressão entre o grupo PRa + PGb quando comparado com os dois grupos intermediários (PRa + PGa, PRb + PGb). Já o miR-191 apresentou diferença estatística em sua expressão entre os grupos PRa + PGb (alta fertilidade) e PRb + PGa (baixa fertilidade), sendo dois grupos de interesse comercial. Por fim, o miR-204 apresentou uma redução em sua expressão no grupo PRb + PGb quando comparado ao grupo PRa + PGb, demonstrando influência da baixa perda gestacional, além de uma separação evidente entre os dois grupos de interesse,

sendo eles PRa + PGb e PRb + PGa. Considerando $p < 0,05$ como significativo estatisticamente, demonstrados na Figura 4.

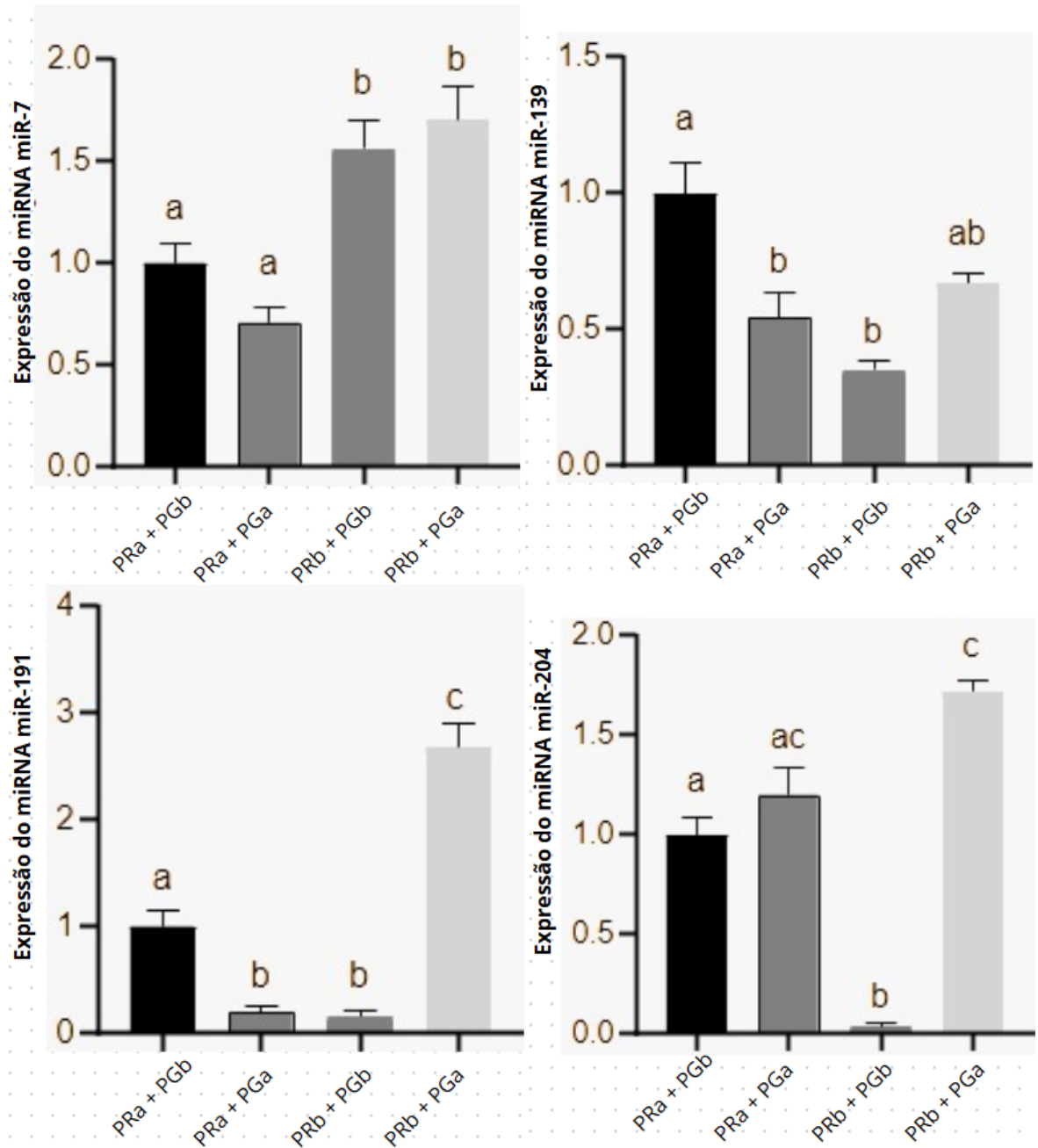


Figura 4 – Diferença de expressão dos miRNAs entre grupos conjuntos. Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$) apresentaram letras diferentes. PRa: alta prenhez, PRb: baixa prenhez; PGb: baixa perda gestacional; PGa: alta perda gestacional.

6. DISCUSSÃO

A utilização de dados de campo se provou eficaz na avaliação de fertilidade de touros, juntamente com a técnica de análise de Gibbs (BLUPF90) (MISZTAL et

al., 2002; BERRY et al., 2011) faz com que a utilização de um banco de dados a campo de IATF integrando diferentes variáveis permita a seleção de animais com uma acurácia maior do que taxas a campo de prenhez por inseminação artificial. Isto ocorre por utilizar uma grande quantidade de variáveis interligadas ao resultado da inseminação, demonstrando uma representação do desempenho real daquele animal. Isto é devido à utilização do touro em diferentes realidades que podem alterar o resultado da inseminação, características como categoria e escore corporal da vaca inseminada tem impacto direto na taxa de concepção. Quando tais variáveis são levadas em consideração para o cálculo da avaliação, é possível gerar um resultado mais próximo do desempenho intrínseco do animal, aumentando a confiabilidade do dado gerado. A integração de métodos como este e técnicas de avaliações ômicas, como a avaliação de miRNAs, podem aumentar significativamente a precisão de avaliações genéticas e decisões na reprodução.

Devido a utilização de doses criopreservadas proveniente de centrais de coleta e distribuição de sêmen, era esperado que as partidas apresentassem parâmetros comerciais, pois os touros passam por uma triagem prévia, descartando casos extremos e algumas patologias. A avaliação seminal indicando morfologia dentro dos parâmetros aceitáveis pelo CBRA 2013 sem diferença estatística na motilidade total média entre os grupos de alta e baixa prenhez, e alta e baixa perda gestacional pode ser pois diferentes partidas de sêmen, mesmo dentre os parâmetros aceitáveis de morfologia e motilidade podem apresentar baixas taxas de concepção a campo (BARBOSA et al., 2005). Isto ocorre devido a quantidade de fatores que estão ligados ao potencial reprodutivo, tornando difícil a capacidade de predição da fertilidade através somente da avaliação seminal (ROSÁRIA et al., 2009).

Foi observado um aumento significativo da expressão do miR-7 nas partidas avaliadas de Baixa Prenhez quando comparados aos animais de Alta Prenhez, não sendo observados efeitos da Perda Gestacional sob a expressão deste miRNA. Sakr et al (2023) relataram que Ocu-let-7a-5p foi um dos microRNAs mais abundantes em vesículas extracelulares (EVs) de plasma seminal de coelhos férteis e subférteis, no entanto, ocu-miR-7a-5p foi diminuído em EVs de coelhos férteis em comparação com os subférteis, apresentando

538 resultado semelhante ao apresentado neste estudo. Diversos estudos anteriores
539 utilizando animais ou humanos comparando grupos férteis e subférteis ou
540 inférteis, ou quadros de azoospermia comparados com normospermia relataram
541 diferenças nos níveis de expressão deste miRNA (WU et al., 2013; DOMINGUES
542 et al., 2020, 2021; MOKÁNZKI et al., 2020; SAKR et al., 2023; ZHAO et al., 2022).
543 Também foi relatado uma correlação negativa estatisticamente significativa entre
544 a concentração espermática e os níveis de expressão de miR-7-1-3p e let-7a em
545 espermatozoides e plasma seminal (MOKÁNZKI et al., 2020), os resultados
546 indicam que a influência do miR-7 na capacidade reprodutiva masculina vão além
547 da concentração espermática em casos de inseminação artificial. Wu et al (2013)
548 relataram que ciclos de congelamento-descongelamento (até 10 ciclos) tiveram
549 efeitos mínimos nos níveis de expressão do miR-7-1-3p, e que se encontra em
550 uma forma estável no plasma seminal, além de ser resistente à atividade da
551 ribonuclease (RNase), o que é um pré-requisito importante para sua utilidade
552 clínica como biomarcador.

553 Em relação ao miR-204, foi observado uma tendência no aumento da
554 expressão no grupo de baixa perda gestacional, quando comparado aos touros de
555 alta perda, se tornando ainda mais evidente em touros que apresentaram baixa
556 taxa de prenhez. O miR-204 atua na regulação da espermatogênese afetando
557 genes, como o SIRT1, envolvidos na proliferação de células-tronco
558 espermatogoniais (NIU et al., 2016). Além disso, sua expressão reduzida está
559 associada à síndrome de células de Sertoli, uma condição associada à
560 infertilidade, evidenciando seu papel na manutenção da espermatogênese (ABU-
561 HALIMA et al., 2014). Estudos em camundongos mostraram que o estresse
562 paterno prolongado pode alterar a expressão de miRNAs no esperma, incluindo o
563 miR-204, esses miRNAs podem, por sua vez, regular mRNAs maternos no oócito,
564 influenciando as respostas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) na prole ao
565 estresse, outra interação consiste no gene materno Trip12 (*thyroid hormone*
566 *receptor interactor 12*), que é um alvo putativo do bta-miR-204 e desempenha um
567 papel importante na embriogênese, o que poderia justificar a influência nas
568 perdas gestacionais (ZHOU et al., 2020).

569 Cassuto et al (2024) consideraram o miR-191 um dos microRNAs mais
570 estáveis e expressos em espermatozoides de indivíduos férteis, enquanto Xu et al

(2020) demonstraram uma correlação significativa entre a expressão de hsa-mir-191-5p e a morfologia do espermatozoide. A análise individual entre grupos de prenhez e grupos de perda mostrou um indício ($p = 0,15/0,16$ respectivamente) de aumento na expressão de indivíduos férteis (alta prenhez ou baixa perda gestacional), resultado esperado conforme a literatura. Já a análise dos grupos conjuntos demonstrou um aumento da expressão do miR-191 no grupo de baixa fertilidade (baixa prenhez, alta perda gestacional) em relação ao grupo de alta fertilidade (alta prenhez, baixa perda gestacional), Rosenbluth et al (2014) também relataram uma contradição entre a expressão mais alta do hsa-mir-191 no meio de cultura onde observou-se falha do ciclo de fertilização in vitro e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (IVF/ICSI) em relação ao meio em que se observou sucesso. Mesmo sendo considerado um biomarcador promissor para a avaliação da qualidade do esperma e a previsão dos resultados das técnicas de reprodução assistida, é necessária uma validação concreta dos seus efeitos na capacidade reprodutiva masculina.

Os resultados do miR-139 e o miRNA foram inconclusivos neste trabalho. Este é um miRNA ainda pouco explorado na literatura em relação a capacidade reprodutiva masculina. Corral-vazquez et al (2019) investigaram o par de microRNAs hsa-miR-139-5p/hsa-miR-1260a, do qual foi identificado como um candidato a biomarcador de fertilidade, sendo expresso em uma alta porcentagem das amostras de astenozoospermia, teratozoospermia e oligozoospermia analisadas, no entanto, não mostrou diferenças significativas entre pacientes férteis e inférteis na fase de validação, apesar de seu forte potencial inicial. Devido a sua relação em casos patológicos da produção seminal, a utilização de sêmen comercial criopreservado neste estudo pode justificar a falta de diferenças significativas em sua expressão, pois touros utilizados em centrais de coleta e processamento de sêmen passam por uma triagem minuciosa para descartar possíveis patologias que impactam no resultado da inseminação, onde touros que não estão saudáveis e aptos são rapidamente removidos do programa.

Os achados deste estudo sugerem uma relação entre os níveis de expressão do miR-7 e taxas de prenhez em IATF, sendo um possível biomarcador. Já a expressão do miR-204 mostrou tendência em relação a taxas de perdas gestacionais entre 30 a 150 dias após IATF, é necessário investigar os

mecanismos relacionados a expressão deste miRNA que influenciam o desenvolvimento fetal. A taxa de expressão do miR-191 apresentou distinção entre dois grupos de interesse comercial, sendo um aumento na expressão de touros com baixa capacidade reprodutiva (baixa P/IA com alta perda gestacional) em relação a touros com alta capacidade reprodutiva (alta P/IA com baixa perda gestacional), sendo necessário uma validação do potencial como preditor da capacidade reprodutiva masculina. Os resultados das taxas de expressão do miR-139 se apresentaram inconclusivos no cenário investigado.

7. CONCLUSÃO

A avaliação de fertilidade com dados de campo permite uma seleção dos animais mais acurada com sua fertilidade estimada, descartando fatores externos que podem influenciar na capacidade reprodutiva, oferecendo uma padronização melhor em âmbito de pesquisa. Estudos sobre miRNAs relacionados a fertilidade masculina vêm identificando diversos fatores que estão relacionados ao sucesso na reprodução. O aumento da expressão do miR-7 se mostrou promissor como potencial marcador para baixas taxas de concepção em IATF, já o aumento da expressão do miR-204 demonstrou uma tendência como possível marcador de perdas gestacionais. O aumento da expressão do miR-191 pode estar relacionada a uma redução na fertilidade masculina (baixa prenhez e alta perda gestacional).

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É possível ampliar a busca utilizando sondas específicas para miRNAs diferentes baseados na literatura, assim como o sequenciamento dos RNAs dos touros presentes no banco de dados. A integração de outras ciências ômicas, como análises proteômicas, metabolômicas e genômicas, com a análise de tais dados também pode revelar mecanismos importantes para a fertilidade de touros. Uma validação dos possíveis miRNAs como preditores da fertilidade através do diagnóstico e utilização a campo de animais que possuam o perfil de expressão dos miRNAs desejados, para o desenvolvimento de biotecnologia voltada para o diagnóstico da capacidade reprodutiva.

9. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

A elucidação da interação dos miRNAs espermáticos envolvidos em processos relacionados a fertilidade de touros direciona a criação de perfis desejáveis de expressão dos mesmos, possibilitando o diagnóstico precoce de fertilidade de touros. Podendo ser identificados através de técnicas como o qPCR, a geração de um método diagnóstico da capacidade reprodutiva que utilize tais preditores de fertilidade auxilia no redirecionamento de animais aptos ou inaptos para a reprodução, reduzindo custos de manutenção e permitindo a introdução dos mesmos em programas de melhoramento genético para disseminação de características positivas para a produção animal.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne.** Beef Report 2025 Perfil da Pecuária no Brasil. 2025. 46p. Disponível em <https://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2025-perfil-da-pecuaria-no-brasil>. Acesso em 23 de Julho de 2025.
- Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A. M., Hammadeh, M., & Meese, E. (2014). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertility and Sterility*, 101(1). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.009>
- Alves, M. B. R., Arruda, R. P. de, Batissaco, L., Garcia-Oliveros, L. N., Gonzaga, V. H. G., Nogueira, V. J. M., Almeida, F. dos S., Pinto, S. C. C., Andrade, G. M., Perecin, F., da Silveira, J. C., & Celeghini, E. C. C. (2021). Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. *Theriogenology*, 161, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.015>
- Alves, M. B. R., Celeghini, E. C. C., & Belleannée, C. (2020). From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility

Potential. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00791>

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial. INDEX ASBIA 2024. 2024. 7-46p. Disponível em https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA-Anual-2024.pdf. Acesso em 14 de junho de 2025.

Benedetti, C., Pavani, K. C., Gansemans, Y., Azari-Dolatabad, N., Pascottini, O. B., Peelman, L., Six, R., Fan, Y., Guan, X., Deserranno, K., Fernández-Montoro, A., Hamacher, J., Van Nieuwerburgh, F., Fair, T., Hendrix, A., Smits, K., & Van Soom, A. (2024). From follicle to blastocyst: microRNA-34c from follicular fluid-derived extracellular vesicles modulates blastocyst quality. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01059-8>

Berry, D. P., Evans, R. D., & Mc Parland, S. (2011). Evaluation of bull fertility in dairy and beef cattle using cow field data. *Theriogenology*, 75(1), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.002>

Bó, G. A., & Baruselli, P. S. (2014). Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal*, 8(SUPPL. 1), 144–150. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000822>

Bó, G. A., Huguenine, E., de la Mata, J. J., Núñez-Olivera, R., Baruselli, P. S., & Menchaca, A. (2018). Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Animal Reproduction*, 15, 952–962. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0025>

Capra, E., Turri, F., Lazzari, B., Cremonesi, P., Gliozzi, T. M., Fojadelli, I., Stella, A., & Pizzi, F. (2017). Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High- and Low-motile sperm populations. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3394-7>

Carlos, S., Pecuária Sudeste, E., Washington Luiz, R., Machado Med Vet, R., Aurélio Carneiro Bergamaschi, M. M., & Taveira Barbosa, R. (2005). *A importância do exame andrológico em bovinos*. (Circular técnica)

Cassuto, N. G., Boitrelle, F., Mouik, H., Larue, L., Keromnes, G., Lédée, N., Part-
 Ellenberg, L., Dray, G., Ruoso, L., Rouen, A., De Vos, J., & Assou, S. (2025).
 Genome-Wide microRNA Expression Profiling in Human Spermatozoa and Its
 Relation to Sperm Quality. **Genes**, 16(1). <https://doi.org/10.3390/genes16010053>

Corral-Vazquez, C., Salas-Huetos, A., Blanco, J., Vidal, F., Sarrate, Z., & Anton,
 E. (2019). Sperm microRNA pairs: new perspectives in the search for male fertility
 biomarkers. **Fertility and Sterility**, 112(5), 831–841.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.07.006>

de Souza, L. P., Domingues, W. B., Blödorn, E. B., da Silva Nunes, L., Ortiz, H.
 G., Komninou, E. R., & Campos, V. F. (2024). Expression of sperm microRNAs
 related to bull fertility: A systematic review. **Research in Veterinary Science**, 166.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105077>

Dickson, D. A., Paulus, J. K., Mensah, V., Lem, J., Saavedra-Rodriguez, L.,
 Gentry, A., Pagidas, K., & Feig, L. A. (2018). Reduced levels of miRNAs 449 and
 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress. **Translational
 Psychiatry**, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0146-2>

Domingues, W. B., Blodorn, E. B., Martins, A. S. W., Dellagostin, E. N., Komninou,
 E. R., Hurtado, J. I., Corcini, C. D., Varela Junior, A. S., Pinto, L. S., Kremer, F. S.,
 Collares, T., Pinhal, D., Greif, G., Robello, C., Schneider, A., Guo, S., & Campos,
 V. F. (2020). Transfection of exogenous DNA complexed to cationic dendrimer
 induces alterations of bovine sperm microRNAome. **Theriogenology**, 156, 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.025>

Domingues, W. B., Silveira, T. L. R., Nunes, L. S., Blodorn, E. B., Schneider, A.,
 Corcine, C. D., Varela Junior, A. S., Acosta, I. B., Kütter, M. T., Greif, G., Robello,
 C., Pinhal, D., Marins, L. F., & Campos, V. F. (2021). GH Overexpression Alters
 Spermatic Cells MicroRNAome Profile in Transgenic Zebrafish. **Frontiers in
 Genetics**, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.704778>

Etezadi, A., Akhtare, A., Asadikalameh, Z., Aghaei, Z. H., Panahinia, P., Arman,
 M., Abtahian, A., Khorasani, F. F., & Hazari, V. (2024). Linc00513 sponges miR-7
 to modulate TGF- β signaling in azoospermia. **European Journal of Translational
 Myology**, 34(3), 1–7. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2024.12516>

- Fagerlind, M., Stålhammar, H., Olsson, B., & Klinga-Levan, K. (2015). Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. ***Reproduction in Domestic Animals***, 50(4), 587–594. <https://doi.org/10.1111/rda.12531>
- Farias Campos, V., Urtiaga, G., Gonçalves, B., João, I., Deschamps, C., & Collares, T. (2011). ***MicroRNAs e seu papel no desenvolvimento embrionário***. ***MicroRNAs and its role in embryonic development***. 1, 85–93.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. ***Cell***, 123(4), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.022>
- Grinchuk, O. V., Jenjaroenpun, P., Orlov, Y. L., Zhou, J., & Kuznetsov, V. A. (2009). Integrative analysis of the human cis-antisense gene pairs, miRNAs and their transcription regulation patterns. ***Nucleic Acids Research***, 38(2), 534–547. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp954>
- Gross, N., Kropp, J., & Khatib, H. (2017). MicroRNA signaling in embryo development. In ***Biology*** (Vol. 6, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology6030034>
- Jia, B., Zhang, L., Ma, F., Wang, X., Li, J., Diao, N., Leng, X., Shi, K., Zeng, F., Zong, Y., Liu, F., Gong, Q., Cai, R., Yang, F., Du, R., & Chang, Z. (2022). Comparison of miRNA and mRNA Expression in Sika Deer Testes With Age. ***Frontiers in Veterinary Science***, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.854503>
- Kasimanickam, V., Kumar, N., & Kasimanickam, R. (2022). Investigation of Sperm and Seminal Plasma Candidate MicroRNAs of Bulls with Differing Fertility and In Silico Prediction of miRNA-mRNA Interaction Network of Reproductive Function. ***Animals***, 12(18). <https://doi.org/10.3390/ani12182360>
- Konrad, L., Keilani, M. M., Laible, L., Nottelmann, U., & Hofmann, R. (2006). Effects of TGF-betas and a specific antagonist on apoptosis of immature rat male germ cells in vitro. ***Apoptosis***, 11(5), 739–748. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-5542-z>

754 Kotaja, N. (2014). MicroRNAs and spermatogenesis. In ***Fertility and Sterility***
 755 (Vol. 101, Issue 6, pp. 1552–1562). Elsevier Inc.
 756 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.025>

757 Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rå Dmark,
 758 O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). ***The nuclear RNase III Drosha initiates***
 759 ***microRNA processing***. www.nature.com/nature

760 Misztal, I., Tsuruta, S., Strabel, T., Auvray, B., Druet, T., & Lee, D. H. (2002).
 761 ***BLUPF90 AND RELATED PROGRAMS (BGF90)***.
 762 <http://www.ozemail.com.au/~milleraj>.

763 Mokánszki, A., Molnár, Z., Varga Tóthné, E., Bodnár, B., Jakab, A., Bálint, B. L., &
 764 Balogh, I. (2020). Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal
 765 plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic
 766 males. ***Human Fertility***, 23(4), 246–255.
 767 <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1562241>

768 MOROTTI, F.; LORENZETTI, E.; SENEDA, M. M. Artificial Insemination Program
 769 in Cattle. ***Sustainable Agriculture Reviews***, v. 54. Cham: Springer, 2021.

770 Monteiro, P. L. J., Consentini, C. E. C., Andrade, J. P. N., Beard, A. D., Garcia-
 771 Guerra, A., Sartori, R., & Wiltbank, M. C. (2023). Research on timed AI in beef
 772 cattle: Past, present and future, a 27-year perspective. In ***Theriogenology*** (Vol.
 773 211, pp. 161–171). Elsevier Inc.
 774 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.07.037>

775 Niu, B., Wu, J., Mu, H., Li, B., Wu, C., He, X., Bai, C., Li, G., & Hua, J. (2016).
 776 miR-204 regulates the proliferation of dairy goat spermatogonial stem cells via
 777 targeting to Sirt1. ***Rejuvenation Research***, 19(2), 120–130.
 778 <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1719>

779 Perge, P., Nagy, Z., Decmann, Á., Igaz, I., & Igaz, P. (2017). Potential relevance
 780 of microRNAs in inter-species epigenetic communication, and implications for
 781 disease pathogenesis. ***RNA Biology***, 14(4), 391–401.
 782 <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1251001>

Pohler, K. G., & Oliveira Filho, R. Vander. (2024). Impact of the Sire on Pregnancy Loss. In ***Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*** (Vol. 40, Issue 1, pp. 121–129). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2023.08.006>

Pons, S., Asano, T., Glasheen, E., Miralpeix, M., Zhang, Y., Fisher, T. L., Myers, M. G., Sun, X. J., & White, M. F. (1995). The Structure and Function of p53 PIK Reveal a New Regulatory Subunit for Phosphatidylinositol 3-Kinase. In ***MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*** (Vol. 15, Issue 8).

Rosária, R., Maziero, D., Crespilho, A. M., De, C., Freitas-Dell’aqua, P., Dell’aqua Junior, J. A., & Ozanan Papa, F. (2009). ***Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade*** (Issue 6). www.cbpa.org.br.

Rosenbluth, E. M., Shelton, D. N., Wells, L. M., Sparks, A. E. T., & Van Voorhis, B. J. (2014). Human embryos secrete microRNAs into culture media - A potential biomarker for implantation. ***Fertility and Sterility***, 101(5), 1493–1500. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.058>

Sakr, O. G., Gad, A., Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y. N., Prochazka, R., Rizos, D., & Rebollar, P. G. (2023). Characterization and identification of extracellular vesicles-coupled miRNA profiles in seminal plasma of fertile and subfertile rabbit bucks. ***Theriogenology***, 209, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.020>

Silva, C. S., Vianna da Costa-e-Silva, E., Nunes Dode, M. A., Mendes Cunha, A. T., Garcia, W. R., Sampaio, B. F. B., Borges Silva, J. C., Vaz, F. E. M., Kerns, K., Sutovsky, P., & Nogueira, E. (2023). Semen quality of Nellore and Angus bulls classified by fertility indices and relations with field fertility in fixed-time artificial insemination. ***Theriogenology***, 212, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.09.001>

Tan, K. A. L., Turner, K. J., Saunders, P. T. K., Verhoeven, G., De Gendt, K., Atanassova, N., & Sharpe, R. M. (2005). Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in sertoli cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. ***Biology of Reproduction***, 72(5), 1151–1160. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.037689>

- Thapliyal, A., Tomar, A. K., Naglot, S., Dhiman, S., Datta, S. K., Sharma, J. B., Singh, N., & Yadav, S. (2024). Exploring Differentially Expressed Sperm miRNAs in Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss and Their Association with Early Embryonic Development. *Non-Coding RNA*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/ncrna10040041>
- Thundathil, J. C., Dance, A. L., & Kastelic, J. P. (2016). Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. In *Theriogenology* (Vol. 86, Issue 1, pp. 397–405). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.054>
- Van Wynsberghe, P. M., Chan, S. P., Slack, F. J., & Pasquinelli, A. E. (2011). Analysis of microRNA Expression and Function. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 106, pp. 219–252). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-544172-8.00008-6>
- Wainstein, A., Hassan, S., Barda, S., Lehavi, O., Azem, F., Ben-Dov, I. Z., Hauser, R., & Kleiman, S. E. (2023). MicroRNAs expression in semen and testis of azoospermic men. *Andrology*, 11(4), 687–697. <https://doi.org/10.1111/andr.13394>
- Wu, W., Qin, Y., Li, Z., Dong, J., Dai, J., Lu, C., Guo, X., Zhao, Y., Zhu, Y., Zhang, W., Hang, B., Sha, J., Shen, H., Xia, Y., Hu, Z., & Wang, X. (2013). Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Human Reproduction* (Oxford, England), 28(7), 1827–1836. <https://doi.org/10.1093/humrep/det099>
- Xu, H., Wang, X., Wang, Z., Li, J., Xu, Z., Miao, M., Chen, G., Lei, X., Wu, J., Shi, H., Wang, K., Zhang, T., & Sun, X. (2020). MicroRNA expression profile analysis in sperm reveals hsa-mir-191 as an auspicious omen of in vitro fertilization. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6570-8>
- Yao, Q., Chen, Y., & Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 51, pp. 11–17). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.024>
- Yuan, S., Liu, Y., Peng, H., Tang, C., Hennig, G. W., Wang, Z., Wang, L., Yu, T., Klukovich, R., Zhang, Y., Zheng, H., Xu, C., Wu, J., Hess, R. A., & Yan, W. (2019).

Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(9), 3584–3593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817018116>

Yuan, S., Tang, C., Zhang, Y., Wu, J., Bao, J., Zheng, H., Xu, C., & Yan, W. (2015). miR-34b/c and miR-449a/b/c are required for spermatogenesis, but not for the first cleavage division in mice. *Biology Open*, 4(2), 212–223. <https://doi.org/10.1242/bio.201410959>

Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Liang, S., Hasegawa, K., Giannakakis, A., Poulos, N., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Butzow, R., Weber, B. L., & Coukos, G. (2007). Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(18), 5314–5321. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2660>

Zhang, S., Zhang, Y., Yang, C., Zhang, W., Ju, Z., Wang, X., Jiang, Q., Sun, Y., Huang, J., Zhong, J., & Wang, C. (2015). 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*, 92(6). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.126672>

Zhang, Y., Yun, Z., Gong, L., Qu, H., Duan, X., Jiang, Y., & Zhu, H. (2018). Comparison of miRNA Evolution and Function in Plants and Animals. *MicroRNA*, 7(1), 4–10. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180126163031>

Zhang, Y., Zeng, C. J., He, L., Ding, L., Tang, K. Y., & Peng, W. P. (2015). Selection of endogenous reference microRNA genes for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction studies of boar spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*, 83(4), 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.027>

Zhao Shaokang, Sun Wenqiang, Chen Shi-Yi, Li Yuchao, Wang Jie, Lai Songjia, & Jia Xianbo. (2022). The exploration of miRNAs and mRNA profiles revealed the molecular mechanisms of cattle-yak male infertility. *Frontiers in Veterinary Science*.

875 Zhou, H., Liu, J., Sun, W., Ding, R., Li, X., Shangguan, A., Zhou, Y., Worku, T.,
876 Hao, X., Khan, F. A., Yang, L., & Zhang, S. (2020). **Differences in small**
877 **noncoding RNAs profile between bull X and Y sperm.** *PeerJ*, 8.
878 <https://doi.org/10.7717/peerj.9822>