MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE QUALIDADE ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE MEDIÇÃO DE MICRORNAS

AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS [1]; WILLIAM BORGES DOMINGUES[2]; EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN[2]; EDUARDO BIERHALS BLÖDORN[2]; ELIZA ROSSI KOMNINOU[2]; VINICIUS FARIAS CAMPOS[3]

[1]Laboratório de genômica Estrutural – CDTec – UFPel – amandaweege98@gmail.com
[2] Laboratório de genômica Estrutural – CDTec – UFPe l– williamwwe@yahoo.com.br;edu.ndell@gmail.com;edu.bblodorn@gmail.com;elizarossikom@gmail.com
[31]Laboratório de genômica Estrutural – CDTec – UFPel – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A criação de gado bovino no Brasil é a atividade econômica que ocupa a maior extensão de terras atualmente, sendo considerada um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial (SILVA et al, 2013; PEZZOPANE et al, 2018). Nos últimos anos a forte pressão mundial por qualidade e padronização dos produtos de origem animal, somada à disputa por espaço entre a pecuária e agricultura provocaram um crescimento acelerado das técnicas de reprodução artificial no país (DE SOUZA, ABADE, 2019).

A aplicação de biotecnologias para a reprodução animal se tornou uma ferramenta importante para acelerar o avanço genético dos rebanhos bovinos, uma vez que as mesmas visam elevar a capacidade reprodutiva de animais de alto mérito genético, gerando rebanhos mais produtivos e consequentemente um maior impacto econômico (VARAGO et al., 2008). Entre as técnicas biotecnológicas usadas nos dias de hoje, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) vem se difundindo como opção nas fazendas em todo o Brasil para a multiplicação e aceleração do melhoramento genético (VARAGO et al., 2008; FIGUEREDO et al., 2018). O uso de sêmen criopreservado é indispensável para a PIVE, e durante o processo de congelamento, crioprotetores são utilizados com a finalidade de proteger os espermatozoides, oferecendo condições mínimas de sobrevivência e capacitação para que posteriormente ocorra a fertilização *in vitro* (SILVEIRA et al., 2019). Entretanto, a criopreservação induz extensivas modificações biofísicas e bioquímicas não somente na membrana plasmática do espermatozoide, mas também nos componentes internos celulares e moleculares, acarretando na diminuição do potencial de fertilidade das células. Portanto se faz necessária a avaliação da qualidade desses espermatozoides antes de se realizar qualquer técnica de produção in vitro (SILVA et al., 2019).

Atualmente, existe no estado da técnica uma carência em predizer e/ou diagnosticar com robustez a qualidade espermática do sêmen criopreservado, visto que essa predição é realizada por um conjunto de avaliações muitas vezes subjetivas e laboriosas (FREITAS et al., 2009). Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes que possuem a função de regular a expressão de diversos genes, diminuindo ou até mesmo inibindo a síntese de algumas proteínas. O emprego da medição dos níveis de microRNAs como potenciais biomarcadores epigenéticos para diagnosticar o potencial fertilizante dos espermatozoides tem se mostrado

promissor experimentalmente, não só em bovinos, mas também em humanos (HUE et al., 2019; HEIDARY et al., 2019).

Visto isso, o presente estudo teve como objetivo descrever o método de diagnóstico de qualidade de espermatozoides bovinos através da medição dos níveis de um conjunto de marcadores epigenéticos microRNAs.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas palhetas de sêmen criopreservadas de touros da raça Holandesa (T1 e T2). O descongelamento foi realizado em banho-maria e seguido de centrifugações, buscando retirar soluções crioprotetoras não desejáveis. A quantificação do número de espermatozoides foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em um microscópio óptico, buscando a padronização de $50x10^6$ de espermatozoides em ambos os grupos T1 e T2, os quais foram transferidos para um tubo tipo eppendorf para a posterior extração de RNA total.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a um período de incubação com um tampão de lise de células somáticas. A extração de RNA total das amostras de espermatozoides foi feita com o auxílio de kit comercial baseado em colunas com membrana de gel de sílica. Após a extração, realizou-se a quantificação da concentração e pureza do RNA extraído por espectrofotometria de luz UV utilizando o equipamento NanoVue (GE Healthcare, EUA). Conseguinte à determinação da concentração ideal de RNA, foi possível realizar a confecção de DNA complementar (cDNA) e o desenho *in silico* de primers para a medição dos níveis dos microRNAs de interesse. Através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR), foi realizada a análise de seis microRNAs (miR-17-5p, miR-26a-5p, miR-20a-5p, miR-486-5p, miR-122-5p e miR-184) nas duas amostras.

Ainda, para comprovação do método de diagnóstico de qualidade espermática através da medição dos níveis de microRNAs, as amostras de sêmen foram também analisadas através do sistema computadorizado de análise espermática (CASA), método que gera informações relacionadas às propriedades cinéticas dos espermatozoides. Os parâmetros de cinética e motilidade espermática analisados foram: motilidade total, motilidade progressiva, velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto (VSL), velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido (VCL), velocidade média ininterrupta do trajeto (VAP), porcentagem de espermatozoides viáveis com acrossoma íntegro (não reagido) e porcentagem de espermatozoides inviáveis com acrossoma não íntegro (reagido).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração e qualidade do RNA extraído foi avaliada levando em consideração a razão entre as absorbâncias 260nm e 280nm e as amostras extraídas apresentaram qualidade e concentração entre o intervalo considerado satisfatório para as etapas posteriores do método.

A partir da análise dos dados de medição dos níveis dos microRNAs foi possível observar que, no touro 1 os níveis dos microRNAs miR-17-5p, miR-26a-

5p, miR-20a-5p se apresentaram aumentados, enquanto os microRNAs miR-486-5p, miR-122-5p, miR-184 estavam diminuídos quando comparados com o touro 2.

Através de uma análise *in silico,* observamos que os microRNAs utilizados no método proposto estão intimamente ligados a vias moleculares (como por exemplo, PI3K/AKT, PTEN e STAT3), as quais têm papel importante na espermatogênese, mantendo o funcionamento inicial e a maturação das células espermáticas, aumentando a capacidade destas células em gerar um embrião através da fertilização *in vitro*.

Mais especificamente, a desregulação destes microRNAs acabam por perturbar as defesas antioxidantes do espermatozoide, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, diminuindo os níveis celulares de ATP e o potencial da membrana mitocondrial, podendo levar à indução da morte celular.

Os resultados de todos os parâmetros de motilidade e cinética espermática apresentaram valores diferentes entre os dois animais analisados ($p<0,05$). Estes resultados acabam corroborando com os resultados observados na análise de medição dos níveis de microRNAs, onde os Touros 1 e 2 apresentaram padrões de expressão antagônicos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados através da metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando a medição dos níveis dos microRNAs no sêmen de interesse se mostraram condizentes e correlacionados com as demais avaliações adotadas, permitindo um diagnóstico mais robusto de qualidade de amostras de sêmen. O método encontra-se registrado na forma de Patente de Invenção e depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o número de acesso BR 10 2018 076020 3, podendo vir a ser transferida para o setor privado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PEZZOPANE, J. R. M. et al. Benefícios ambientais e agronômicos da adoção de sistemas integrados de produção pecuária. In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 56., 2018, Campinas, SP. Anais... Campinas, SP: SOBER, 2018., 2018.

SILVA, A. W. L. et al. A sustentabilidade agropecuária segundo a concepção e a prática de extensionistas rurais do Oeste catarinense. **Sistemas & Gestão**, v. 8, n. 2, p. 146-159, 2013.

DE SOUZA, N. S.; ABADE, C. C. Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 3, p. 95-108, 2019.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. de A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

SILVA, J. C. B. et al. Uso de sêmen refrigerado bovino: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 43, n. 2, p. 284-288, 2019.
SILVEIRA, M. M. et al. Viabilidade de embriões bovinos produzidos in vitro transportados por diferentes tempos em meio de manutenção com antioxidantes. 2019.

HUA, M. et al. Identification of small non-coding RNAs as sperm quality biomarkers for in vitro fertilization. **Cell discovery**, v. 5, n. 1, p. 20, 2019.
FIGUEIREDO, A. C. S. et al. Panorama da produção de embriões bovinos no Brasil de 1995 a 2015. 2018.

FREITAS, C. P. et al. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 213-222, 2009.

CAPRA, E. et al. 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, dez. 2017.

HEIDARY, Z. et al. MicroRNA profiling in spermatozoa of men with unexplained asthenozoospermia. **Andrologia**, v. 51, n. 6, p. e13284, jul. 2019.