



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

MicroRNAs: a new approach to predict fertility in bulls

Maíra Bianchi Rodrigues Alves^{1,4}, Rubens Paes de Arruda², Juliano Coelho da Silveira³, Felipe Percin³, Eneiva 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. Dessa 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 (Braundmeier 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.

Os microRNAs (miRNAs), por serem reguladores da expressão gênica com ação pós-transcricional, possuem grande potencial na regulação das características reprodutivas. Diversos estudos já mostraram o papel dessas moléculas na espermatogênese e na maturação espermática (Belleannée et al., 2012; Kotaja, 2014). Estudos com humanos e bovinos têm mostrado que há diferenças nos perfis de miRNAs seminais entre amostras de indivíduos férteis e inférteis (Abu-Halima et al., 2014; Fagerlind et al., 2015).

Dessa forma, tendo em vista a problemática relacionada ao diagnóstico da fertilidade e o potencial papel dos miRNAs como reguladores das funções reprodutivas, o objetivo da presente revisão é compilar os estudos que mostrem a relação dos miRNAs com a fertilidade masculina. Para isso será estabelecida uma linha do tempo (Figura 1) abordando a evolução das técnicas morfofuncionais bem como a evolução dos estudos dos RNAs espermáticos.

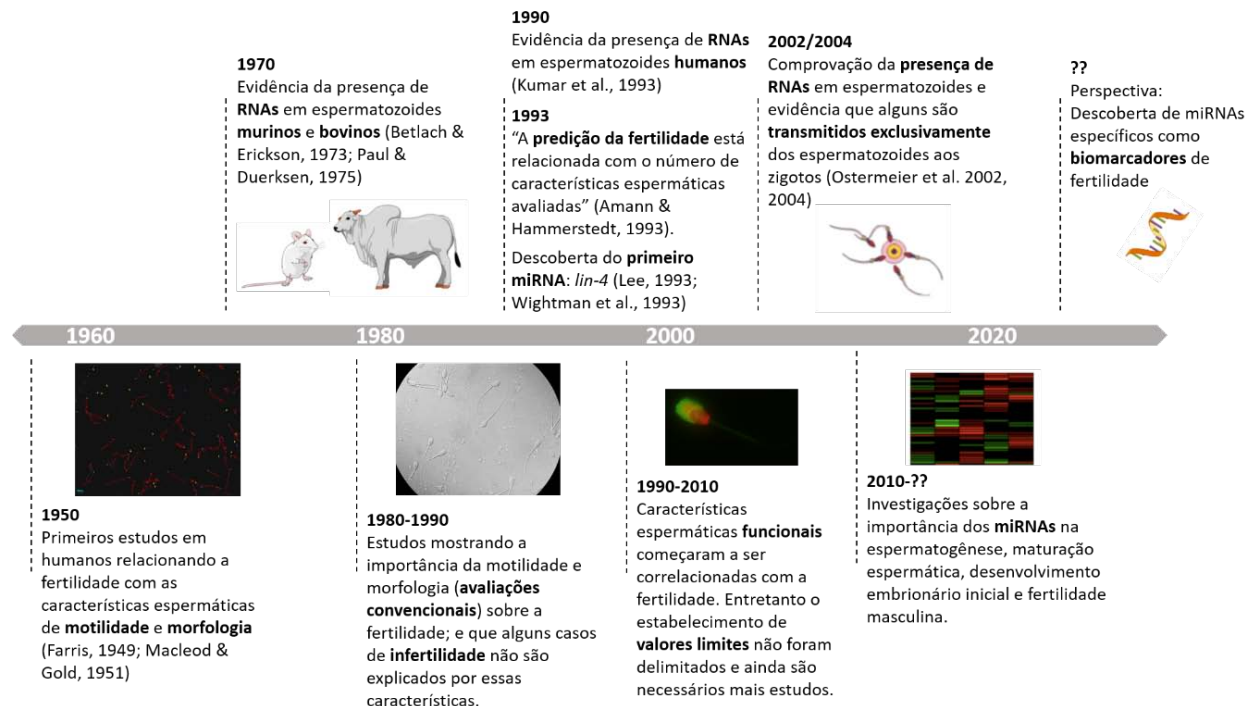


Figura 1. Figura ilustrativa demonstrando a evolução das avaliações espermáticas e as perspectivas das avaliações futuras.

Avaliações espermáticas convencionais

Segundo Arruda et al. (2011), a motilidade, o vigor e a morfologia estão agrupadas como avaliações espermáticas clássicas. Pelo baixo custo, facilidade de execução e relação com a fertilidade, estas avaliações são rotineiramente realizadas nas avaliações espermáticas (Braundmeier e Miller, 2001; Foote, 2003; Seidel, 2012). Entretanto, embora essas avaliações muitas vezes correlacionem-se com a fertilidade, existe variabilidade em função de variações decorrentes da realização da técnica e de cada amostra (Seidel, 2012).

A motilidade e o vigor, característica diretamente relacionada com a motilidade progressiva, apresentam importante papel fisiológico na reprodução. Essas funções espermáticas estão intimamente relacionadas com a capacidade dos espermatozoides em alcançar o oviduto (Saacke et al., 1994) e têm sido relacionadas com a fertilidade humana desde a década de 50 (Farris, 1949; Macleod e Gold, 1951). Em veterinária, muitos estudos correlacionam essas características com o potencial fértil da amostra. Gillan et al. (2008), estudando a fertilidade de touros a campo, observaram correlação positiva de 67% entre a motilidade espermática subjetiva e a taxa de fertilidade. No entanto, Hall (1981), pesquisando a infertilidade masculina humana, observou que 29% dos pacientes que foram classificados apresentando motilidade espermática normal, apresentavam subfertilidade em testes *in vitro*. Ademais, Flowers (1997) relatou que amostras com motilidade acima de 60% não apresentam relação com a fertilidade. Dessa forma, a avaliação da motilidade, embora seja importante de ser realizada, possui resultados variados em relação a sua predição da fertilidade (Braundmeier e Miller, 2001).

A morfologia também possui grande importância em ser avaliada, visto que verifica alterações na estrutura espermática que podem estar relacionadas com disfunções na espermatogênese ou na maturação espermática, dentre outros processos (Barth e Oko, 1989; Arruda et al., 2015). Segundo Seidel (2012), as anormalidades apresentam alta correlação com a fertilidade quando a amostra apresenta mais de 30% de células anormais. Além disso, touros de alta fertilidade apresentaram maior quantidade de células normais (Correa et al.,



1997) e foi verificada a correlação negativa de 76% entre a quantidade de células anormais e a fertilidade (Gillan et al., 2008).

Entretanto, apesar de haver correlação com a fertilidade, a avaliação da morfologia torna-se limitada por existirem muitas técnicas disponíveis e diversas formas de classificação dos espermatozoides (Arruda et al., 2011). Devido a estes fatos, o estabelecimento de valores padrão torna-se dificultoso (Prathima et al., 2015). Da mesma forma, a comparação dos valores entre laboratórios é complexa e há necessidade de técnicos capacitados (Braundmeier e Miller, 2001).

Assim, as avaliações convencionais, apesar de na maioria das vezes apresentarem correlação com a fertilidade, muitas vezes não são eficientes em explicar diferentes fenótipos de fertilidade. Além disso, essas técnicas possuem limitações relacionadas à subjetividade e à dificuldade de estabelecimento de limiares. Por tudo isso, torna-se necessária a aplicação de novas técnicas, e assim surgem as técnicas funcionais de avaliação espermática.

Avaliações espermáticas funcionais

A aplicação de meios computadorizados, da microscopia de fluorescência e da citometria de fluxo para a avaliação das características funcionais espermáticas são exemplos da tentativa de minimizar a subjetividade das avaliações convencionais. Estas tecnologias tornam possível realizar avaliações aprofundadas do movimento espermático e da integridade e funcionalidade das estruturas celulares.

A avaliação da cinética espermática pelo sistema de análise computadorizada da motilidade (CASA) foi incluída no manual de análise de sêmen da *World Health Organization* (WHO) na década de 90 (Prathima et al., 2015) ganhando bastante destaque. Embora o sistema CASA possua correlação com a fertilidade, esta aumenta conforme maior número de características avaliadas pelo CASA forem consideradas (Farrell et al., 1998). Assim, a predição da fertilidade pela motilidade total apresentou r^2 de 0,34; enquanto que o conjunto de ALH (*amplitude of lateral head displacement*/amplitude lateral de cabeça), BCF (*beat cross frequency*/frequência de batimento), LIN (*linearity*/linearidade), VAP (*average path velocity*/velocidade do trajeto) e VSL (*straight line velocity*/velocidade progressiva) apresentou r^2 de 0,98 (Farrell et al., 1998). Entretanto, variáveis como o VSL apresentam tanto correlação positiva de 63,6% (Gillan et al., 2005) quanto negativa de 34% (Sellem et al., 2015). Dessa forma, são necessários mais estudos para o estabelecimento de valores preditivos.

Além das avaliações de cinética pelo CASA, a microscopia de fluorescência (MF) e a citometria de fluxo (CF) também são utilizadas nas avaliações funcionais. A grande vantagem da CF é a avaliação de um expressivo número de espermatozoides: 10.000 espermatozoides, numa velocidade de leitura de 8.000-20.000 células/segundos; pela MF normalmente são avaliadas 200 células (Gillan et al., 2005). Entretanto, a CF possui alto custo e necessita de constante manutenção e pessoal qualificado. Assim, diferentes estudos têm sido realizados com a MF e resultados interessantes têm sido obtidos. Nosso grupo de pesquisa, por meio da MF, mostrou que partidas de sêmen com avaliações convencionais semelhantes e com quantidades de células PIAIA (espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de função mitocondrial) diferentes apresentaram taxas de prenhez distintas a campo (Oliveira et al., 2014).

Além destas avaliações, a investigação de espécies reativas de oxigênio (Simões et al., 2013), da integridade de DNA espermático (Alves et al., 2016; Waterhouse et al., 2006) e das proteínas espermáticas (Roncoletta et al., 2006) também podem ser realizadas. Muitos estudos relacionam estas técnicas com a fertilidade; entretanto, muitas vezes são observadas partidas que possuem essas características consideradas satisfatórias e não possuem bom desempenho reprodutivo. Isso ocorre devido à fertilidade ser multifatorial e assim, quanto mais avaliações morfofuncionais forem realizadas, maior será o poder de predição da fertilidade (Amann e Hammerstedt, 1993). Entretanto, existe a necessidade de técnicas que sejam diretas e consigam prever a fertilidade com precisão, baixo custo e rapidez; assim, acredita-se que as técnicas moleculares supram essa demanda.

Avaliações espermáticas moleculares: RNAs espermáticos

Por muitos anos acreditou-se que o espermatozoide possuía a única e exclusiva função de transportar o DNA paterno ao ócito (Krawetz, 2005). A evidência da presença de RNAs espermáticos, apesar de ter tido seus primeiros relatos na década de 70 em espermatozoides murinos (Betlach e Erickson, 1973) e bovinos (Paul e Duerksen, 1975) e depois na década de 90 em espermatozoides humanos (Kumar et al., 1993), foi, por muitos anos, relevada e considerada advinda de contaminação mitocondrial (Krawetz, 2005). Somente no século 21 foram descritos RNAs presentes em espermatozoides de homens férteis (Ostermeier et al., 2002).

O estudo do perfil de RNAs presentes em espermatozoides de homens férteis em 2002 (Ostermeier et al., 2002) e a comprovação de que alguns RNAs são transmitidos exclusivamente do espermatozoide para o zigoto em 2004 (Ostermeier et al., 2004) foram marcos importantes e abriram perspectivas para novas linhas de pesquisas. Assim, diversos grupos começaram a estudar a relação dos RNAs com a fertilidade. Em 2008, Steger et al. demonstraram que, em amostras de testículos e de sêmen de homens inférteis, os níveis de expressão dos

mRNAs da protamina 1 e 2 apresentam alterações e a expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2* foi aumentada. Já em estudo com espermatozoides de touros de alta fertilidade, foi avaliado aumento da expressão dos transcritos: adenilato quinase 1 (AK1), integrina $\beta 5$ (IB), fator de crescimento neural (NGF), inibidor tecidual das metaloproteínas (TIMP), pequeno polipeptídeo N nuclear de ribonucleoproteína (SNRPN) e fosfolipase C (PLC ζ) (Kasimanickam et al., 2012).

Apesar do citoplasma espermático ser limitado e conter de 10-20fg de RNA em espermatozoides humanos (Krawetz, 2005), existe uma gama grande de RNAs presentes nos espermatozoides (Boerke et al., 2007): 1) mRNA sem função no oócito: normalmente são remanescentes da espermatogênese, não possuem função conhecida no oócito fecundado e podem até ser deletérios ao desenvolvimento embrionário. Exemplo: mRNA da protamina-2 (Ziyyat e Lefèvre, 2001); 2) mRNA com potencial função no oócito: produzidos na espermátide (Krawetz, 2005), com função conhecida no oócito fecundado. Exemplo: mRNA da PLC ζ , que atua na ativação oocitária (Saunders et al., 2002); 3) mRNA estrangeiros: adquiridos pelo espermatozoide durante a passagem pelo epidídimo e pela uretra. A comunicação do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias com os espermatozoides pode ser realizada por meio de vesículas extracelulares conhecidas como epididimossomos ou prostassomos, dependendo da origem (Sullivan e Saez, 2013). Há evidências de que epididimossomos carregam RNAs importantes aos espermatozoides (Belleannée et al., 2013). Exemplo: mRNA da clusterina (Boerke et al., 2007); 4) RNAs de interferência: são transcritos pequenos, não codificadores de proteínas e por isso chamados de RNAs não codificadores (ncRNAs). Podem estar presentes nos espermatozoides e conter potencial função após a fecundação. Neste grupo estão os miRNAs (Kotaja, 2014; Liu et al., 2012).

MiRNAs

O dogma central da biologia molecular preconiza que os genes contidos no DNA transcrevem mRNAs que, por sua vez estão envolvidos no processo de tradução de proteínas (Crick, 1970), havendo exceção dos RNAs estruturais (Mattick, 2003). Entretanto, com o decorrer das investigações sobre o genoma humano, foi verificado que somente 2% dos genes codificam proteínas (Mattick, 2001, 2003). Ainda, foi descrito que regiões do DNA conhecidas por “DNA lixo”, por não desempenharem função aparente, codificavam reguladores pós-transcricionais (Mattick, 2001). Neste contexto, descobriu-se um novo grupo de RNAs, os ncRNAs, dentre eles os miRNAs (Lee, 1993; Wightman et al., 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*. Nestes estudos, conforme as transições das fases larvais, a expressão de *lin-4* aumentava enquanto que a proteína LIN-14 diminuía (Lee, 1993; Wightman et al., 1993). Somente no século XXI foi descoberto o segundo miRNA com função de repressão semelhante, o *let-7*, também em *C. elegans* (Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000).

Os miRNAs foram então vastamente estudados e caracterizados como pequenas moléculas de RNA contendo aproximadamente 22 nucleotídeos (Bartel, 2004). A biossíntese dos miRNAs ocorre no núcleo celular a partir da transcrição pela RNA polimerase II dos transcritos de miRNAs primários (pri-miRNA). Os pri-miRNAs, que contém uma 7-metilguanina (CAP) na extremidade 5' e são poliadenilados na extremidade 3', sofrem o *cropping* pelo complexo *Drosha*-DGCR8 e perdem as extremidades livres 3' e 5'. Assim, o pri-miRNA é convertido em miRNA precursor (pre-miRNA). O pre-miRNA é então transportado para o citoplasma pela proteína Exportina 5. No citoplasma, o pre-miRNA sofre ação da enzima *Dicer* em um processo chamado de *dicing*. Nele 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 (Ha e Kim, 2014; Kim, 2005; Kim e Nam, 2006). A *Dicer* transfere a fita guia para proteínas do tipo Argonauta formando o complexo RISC. Não se sabe ao certo, mas somente a fita madura fica ligada a este complexo. A Argonauta do tipo 2 (AGO2) carregada com a fita guia junto ao complexo inibitório RISC encontra o mRNA alvo e, por meio do pareamento do miRNA com a 3'UTR do mRNA, promove o silenciamento gênico por meio da inibição traducional, processo que ocorre principalmente em mamíferos, ou clivagem do mRNA, comum em plantas (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Kim et al., 2009). De maneira geral, pelo fato de os miRNAs agirem sobre o processo de tradução, impedindo a produção de proteínas, estes são descritos como reguladores pós-transcricionais e apresentam importante papel nos processos fisiológicos (Ha e Kim, 2014).

MiRNAs e Andrologia

Os miRNAs têm sido amplamente estudados nos processos fisiológicos e patológicos, principalmente no câncer (Ha e Kim, 2014). Nos processos reprodutivos, miRNAs têm sido associados com qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário (Feng et al., 2015; Karakaya et al., 2015). Eles têm mostrado também ter importância na regulação da espermatogênese (Kotaja, 2014) e na maturação espermática (Belleannée, 2015; Ni et al., 2011). Estudos com camundongos *knock-out* de *Dicer* em células de Sertoli e em células epididimárias relatam infertilidade e distúrbios na espermatogênese e na produção de hormônios esteroides (Björkgren et al., 2012; Papaioannou et al., 2009).



Além do papel dos miRNAs nos processos fisiológicos, diferentes perfis de miRNAs têm sido associados com infertilidade. Comparando homens normozoospermicos com homens com quadro de astenozoospermia, 50 miRNAs espermáticos apresentaram-se mais expressos e 27 menos expressos. Da mesma forma, homens com quadro de oligoastenozoospermia apresentaram 42 miRNAs mais expressos e 44 menos expressos (Abu-Halima et al., 2013). Homens com quadro de subfertilidade e azoospermia não obstrutiva apresentaram cinco miRNAs com expressão alterada (Abu-Halima et al., 2014).

Em animais domésticos, os miRNAs também têm sido associados com a fertilidade. Espermatozoides de touros que apresentaram qualidade espermática satisfatória e histórico de fertilidade distinto apresentaram sete miRNAs diferencialmente expressos (Govindaraju et al., 2012). Já em touros com histórico de baixa fertilidade, os miRNAs espermáticos bta-miR-502-5p, -1249, -320a, -34c-3p, -19b-3p, -27a-5p e -148b-3p apresentaram maior expressão (Fagerlind et al., 2015). No tocante à qualidade espermática, quatro miRNAs (let-7a, let-7d, let-7e e miR-22) apresentaram expressão aumentada em cachos com altas porcentagens de células espermáticas anormais e baixa motilidade (Curry et al., 2011).

Além dos miRNAs estarem presentes nos espermatozoides, estas moléculas também estão presentes no plasma seminal advindas principalmente dos epidídimos. Os miRNAs podem estar livres ou estarem contidos em vesículas extracelulares que apresentam diferentes conteúdos de miRNAs de acordo com a região do epidídimo (Belleannée et al., 2013; Reilly et al., 2016). Da mesma forma que em espermatozoides, diferentes perfis de miRNAs foram descritos no plasma seminal de homens com azoospermia e astenozoospermia (Wang et al., 2011).

Por fim, existem miRNAs importantes para o desenvolvimento embrionário inicial. Um destes é o miR-34c que, além de ter importância no desenvolvimento embrionário inicial, é transmitido exclusivamente pelo espermatozoide ao zigoto em camundongos (Liu et al., 2012) mas não em bovinos (Tscherner et al., 2014). Dessa forma, por atuarem na maturação espermática, na espermatogênese e também no desenvolvimento embrionário, os miRNAs são muito promissores como marcadores moleculares de fertilidade tanto em humanos como em animais domésticos. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer quais deles relacionam-se ao fenótipo de fertilidade.

Considerações finais

Pelo fato das técnicas morfofuncionais não serem suficientemente imperativas na predição da fertilidade, a busca por marcadores moleculares se faz necessária. Diversos grupos têm investigado o potencial dos miRNAs como biomarcadores e de fato estas moléculas apresentam grande potencial. No entanto, o tema é bastante novo e são necessários mais estudos na área para estabelecer como essas moléculas poderiam regular a fertilidade e determinar as diferenças nos fenótipos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2015/09154-6; 2016/05365-1) pelo auxílio financeiro na realização dos trabalhos do grupo com o assunto.

Referências

- Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, Keller A, Messe E.** A panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fert Steril*, v.102, p.989-997, 2014.
- Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Messe E, Backes C.** Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fert Steril*, v.99, p.1249-1255, 2013.
- Alves MBR, Andrade AFC, Arruda RP, Batissaco L, Florez-Rodriguez AS, Oliveira BMM, Torres MA, Lançoni R, Ravagnani GM, Prado Filho RR, Vellone VS, Losano JD, Franci CR, Nichi M, Celeghini ECC.** 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, p.795-805, 2016.
- Amann RP, Hammerstedt RH.** *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, v.14, p.397-406, 1993.
- Ambros V.** The functions of animal microRNAs. *Nature*, v. 431, p. 350-5, 2004.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.145-151, 2011.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Garcia AR, Carli G, Leite TG, Oliveira LZ, Lançoni R, Rodrigues MDP.** Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.47-60,



2015.

Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, v.116, p.281–297, 2004.

Barth AD, Oko RJ. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. In: Ames (1st ed.) *EUA: Iowa, Iowa State University Press*, 1989.

Belleannée C. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian J Androl*, v.17, p.730-736, 2015.

Belleannée C, Calvo E, Caballero J, Sullivan R. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biol Reprod*, v.89, p.1-11, 2013.

Belleannée C, Calvo E, Thimon V, Cyr DG, Légaré C, Garneau L, Sullivan R. Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *Plos One*, v.7, p. e34996, 2012.

Betlach C, Erickson RA. A unique RNA species from maturing mouse spermatozoa. *Nature*, v.242, 1973.

Björkgren I, Saastamoinen L, Krutskikh A, Huhtaniemi I, Poutanen M, Sipila P. Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. *Plos One*, v.7, p. e38457, 2012.

Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v.68, S147-55, 2007.

Braundmeier AG, Miller DJ. The Search is on: Finding Accurate Molecular Markers of Male Fertility. *J Dairy Sci*, v.84, p.1915-1925, 2001.

Brito LFC. Variations in laboratory semen evaluation procedures and testing. In: *Proceedings of the 23rd Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, 2010, Milwaukee, WI, USA. Milwaukee: NAAB. pp. 61-67, 2010.*

Correa JR, Pace MM, Zavos PM. 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, p.721-731, 1997.

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

Curry E, Safranski TJ, Pratt SL. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology*, v.76, p.1532-1539, 2011.

Fagerlind M, Stalhammar H, Olsson B, Klinga-Levan K. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. *Reprod Domestic Anim*, v.50, p.587-594, 2015.

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-879, 1998.

Farris EJ. The number of motile spermatozoa as an index of fertility in man; a study of 406 semen specimens. *J Urol*, v.6, p.1099-1104, 1949.

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*. *Sci Rep*, v.5, p.8689, 2015.

Flowers WL. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil Suppl*, v.52, p.67-78, 1997.

Foote RH. Fertility estimation: A review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, v.75, p.119-139, 2003.

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.

Gillan L, Kroetsch T, Chis Maxwell WM, Evans G. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci*, v.103, p.201-214, 2008.

Govindaraju A, Uzun A, Robertson L, Atli MO, Kaya A, Topper E, Crate EA, Padbury J, Perkins A, Memili E. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol*, v.10, p.1-10, 2012.

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Nat Rev Mol Cell Biol*, v.15, p.509-524, 2014.

Hall JL. Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril*, v.35, p.457-463, 1981.

Karakaya C, Guzeloglu-Kayisli O, Uyar A, Kallen AN, Babayev E, Bozkurt N, Unsal E, Karabacak O, Seli EL. Poor ovarian response in women undergoing *in vitro* fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. *Fertil Steril*, v.103, p.1469-1476.e3, 2015.

Kasimanickam V, Kasimanickam R, Arangasamy A, Saberivand A, Stevenson JS, Kastelic JP. Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. *Theriogenology*, v.78, p.2007-2019, 2012.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.6, p.376–385, 2005.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.10, p.126-139, 2009.

Kim VN, Nam J. Genomics of microRNA. *Trends Genet*, v.22, p.165-172, 2006.



- Kotaja N.** MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril*, v.101, p.1552-1562, 2014.
- Krawetz SA.** Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet*, v.6, p.633-642, 2005.
- Kumar G, Patel D, Naz RK.** c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res*, v.39, p.111-117, 1993.
- Lee RC.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v.75, p.843-854, 1993.
- Liu W, Pang RTK, Chiu PCN, Wong BPC, Lao K, Lee K.** Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.109, p.490-494, 2012.
- Macleod J, Gold RZ.** The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril*, v.2, p.187-204, 1951.
- Mattick JS.** Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep*, v.2, p.986-991, 2001.
- Mattick JS.** Challenging the dogma: The hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays*, v.25, p.930-939, 2003.
- Ni MJ, Hu ZH, Liu Q, Liu MF, Lu MH, Zhang JS, Zhang L, Zhang YL.** Identification and characterization of a novel non-coding rna involved in sperm maturation. *Plos One*, v.6, p.e26053, 2011.
- Oliveira BMM, Arruda RP, Thomé HE, Maturana Filho M, Oliveira G, Guimarães C, Nichi M, Silva LA, Celeghini ECC.** Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, v.82, p.767-72, 2014.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA.** Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, v.360, p.772-777, 2002.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA.** Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, v.429, p.2603, 2004.
- Papaoiannou MD, Pitetti JL, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, Vejnar CE, Kühne F, Descombes P, Zdobnov EM, McManus MT, Guillou F, Harfe BD, Yan W, Jégou B, Nef S.** Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, v.326, p.250-259, 2009.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan 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, p.86-89, 2000.
- Paul J, Duerksen JD.** Chromatin-associated RNA content of heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell Biochem*, v.9, p.9-16, 1975.
- Prathima T, Ranjani S, Pandiyan N.** History of Semen Analysis. *Chettinad Health City Medical Journal*, v.4, p.63-64, 2015.
- Reilly JN, McLaughlin EA, Stanger SJ, Anderson AL, Hutcheon K, Church K, Mihalas BP, Tyagi S, Holt JE, Eamens AL, Nixon B.** Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Sci Rep*, v.6, p.1-15, 2016.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.** The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v.403, p.901-906, 2000.
- Roncoletta M, Morani ES, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH.** Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.77-87, 2006.
- Saacke RG, Nadir S, Nebel RL.** Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, v.41, p.45-50, 1994.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA.** PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development*, v.3544, p.3533-3544, 2002.
- Seidel GE.** Several insights on evaluation of semen. *Anim Reprod*, v.9, p.329-332, 2012.
- Sellem E, Broekhuijse ML, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EP.** Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, v.84, p.1447-1454, 2015.
- Simões R, Feitosa WB, Siqueira AF, Nichi M, Paula-Lopes FF, Marques MG, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção ME.** Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. *Reproduction*, v.146, p. 433-441, 2013.
- 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. *Hum Reprod*, v.23, p.11-16, 2008.
- Sullivan R, Saez F.** Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: Their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, v.146, p.R21-35, 2013.
- Tscherner A, Gilchrist G, Smith N, Blondin P, Gillis D, Lamarre J.** MicroRNA-34 family expression in bovine gametes and preimplantation embryos. *Reprod Biol Endocrinol*, v.12, p.85, 2014.
- 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.** Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin*



Chem, v.57, p.1722-1731, 2011.

Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, Tverdal A, Flatberg G, Farstad W, Evenson DP, De Angelis PM. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.781, 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.

Ziyyat A, Lefèvre A. Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa. *Hum Reprod*, v.16, p.1449-1456, 2001.
