

Mecanismos epigenéticos nos espermatozoides e o impacto sobre a fertilidade masculina

Epigenetic mechanisms on sperm cells and the impact on male fertility

Ana Beatriz Bossois Moura¹, Raissa Braido Rangel¹, Laura Gabrielli Haupenthal¹, Maria Alice de Almeida², Tiago Henrique Camara De Bem¹, Juliano Coelho da Silveira¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini³, Felipe Perecin¹, Maira Bianchi Rodrigues Alves^{2*}

¹Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), FZEA, USP, Pirassununga, SP, Brasil

²Laboratório de Biotecnologias da Reprodução (LABOR), FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

³Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPAR), FMVZ, USP, Pirassununga, SP, Brasil

Resumo

Por ser uma célula altamente especializada, o espermatozoide apresenta diferentes mecanismos epigenéticos, sendo os principais as metilações do DNA, o código de histonas, os ncRNAs (RNAs não codificadores), e a alta condensação da cromatina pela presença das protaminas. Estes mecanismos interagem entre si, contribuindo para a formação do epigenoma espermático, que modela a carga molecular espermática, que, por sua vez, pode impactar sobre as características do desenvolvimento embrionário e da progênie. Dessa forma, atualmente é consenso que o papel do espermatozoide ultrapassa a entrega de DNA de qualidade para o oócito no momento da fecundação. Pesquisas recentes de diversos grupos, incluindo o nosso, mostram que além da contribuição com DNA de qualidade, o espermatozoide entrega moléculas ao oócito no momento da fecundação que influenciam o desenvolvimento do embrião. Recentemente, essas moléculas de origem espermática (Em inglês: *sperm-borne*) também são associadas com alterações metabólicas e cognitivas da progênie. Embora ainda pouco se entenda como esses mecanismos podem persistir mesmo com o ciclo de reprogramação celular que ocorre logo após a fecundação, é evidente que estes podem impactar as características da progênie. Nesta revisão abordaremos sobre a modulação do epigenoma espermático e seus efeitos no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: vesículas extracelulares, ativação do genoma embrionário, microRNAs, epigenética, bovinos.

Abstract

Since it is a highly specialized cell, the spermatozoa display different epigenetic mechanisms; the main ones are DNA methylation, histone code, ncRNAs (non-coding RNAs), and high chromatin condensation by the presence of protamines. These mechanisms act in synergy contributing to forming the sperm epigenome, which modulates the spermatid molecular cargo, and, may impact embryo and offspring development features. Thus, it is currently a consensus that the role of spermatozoa goes beyond delivering quality DNA to the oocyte at fertilization. Relevant findings from several research groups, including ours, have shown that sperm delivers several molecules to the oocyte at fertilization, beyond the contribution to DNA, which influences the development of the embryo. Recently, these sperm-borne molecules have also been associated with metabolic and cognitive changes in the offspring. Although the mechanism by which these changes can persist even after embryo reprogramming is not completely understood, evidence shows that sperm cell molecular content impacts embryo and offspring development. This review will mainly focus on the modulation of the sperm epigenome and its effects on embryo development.

Keywords: extracellular vesicles, embryonic genome activation, microRNAs, epigenetics, bovines.

Introdução

A fertilidade masculina é determinada pela capacidade do macho em produzir espermatozoides hábeis em fecundar bem como entregar material genético de qualidade ao oócito para gerar uma gestação viável. A habilidade dos espermatozoides em fecundar exige que estes desempenhem características morfofuncionais, tais como motilidade e morfologia, adequadas. Além disso, para tornar mais complexa a

*Correspondência: maira.bianchi@unesp.br

Recebido: 04 de maio de 2023

Aceito: 18 de maio de 2023

determinação da fertilidade masculina, os espermatozoides também devem ser aptos a contribuir para a geração de embrião e progênie saudável. Tais habilidades dependem da qualidade do material genético e também dos atributos intrínsecos espermáticos, isto é, conteúdo molecular e de organelas (Revisado por Alves et al., 2020). Desta forma, a formação adequada de espermatozoide hábil, chamado aqui de *viável* ou *saudável*, capaz de fecundar e contribuir para a geração da prole, é fundamental para a determinação da fertilidade do macho.

A formação de espermatozoides saudáveis depende dos processos adequados de espermatogênese e maturação espermática, em que são estabelecidas as principais características morfofuncionais e intrínsecas dos espermatozoides. Nos últimos 40 anos tem sido observado declínio na fertilidade masculina, estimando-se que 1 em 20 homens seja infértil ou apresente algum tipo de subfertilidade (Levine et al., 2017). Na produção animal, distúrbios na fertilidade do macho podem trazer grandes prejuízos produtivos e econômicos, visto que a criação animal depende fortemente do macho reprodutor, seja em criações baseadas na monta natural ou nas que empregam biotécnicas reprodutivas (Rahman et al., 2017). Embora as principais causas de infertilidade masculina consistam em fatores que afetem a geração dos espermatozoides nos testículos durante a espermatogênese, ou fatores ligados à maturação espermática no epidídimo, cerca de 30% das causas de infertilidade masculina permanecem desconhecidas, principalmente pela falta de conhecimento das características espermáticas intrínsecas (Agarwal et al., 2015; Kovac et al., 2013).

Estas características intrínsecas estão relacionadas com o conteúdo espermático de moléculas e de organelas que atuam tanto na própria célula espermática quanto no embrião. Dentre os fatores que atuam nos embriões, moléculas de RNA de origem espermática, chamadas em inglês de *sperm-borne*, entregues pelo espermatozoide ao oócito no momento da fecundação, atuam sobre a habilidade do embrião em realizar as primeiras clivagens (Liu et al., 2012; Alves et al., 2019), bem como na qualidade da ativação do genoma embrionário (Yuan et al., 2023). Atualmente, essas moléculas têm desafiado os conhecimentos que temos sobre o desenvolvimento embrionário e mostram impacto sobre as características da progênie, persistindo mesmo após o ciclo de reprogramação celular que ocorre após a fecundação (Chen et al., 2016b; Wang et al., 2019; Zheng et al., 2021; Chen, 2022; Lismer e Kimmins, 2023). Assim, há grande interesse em entender como estas moléculas são reguladas nos espermatozoides e como elas atuam no embrião e persistem após a ativação do genoma embrionário, sendo os interessados em aprofundar nestes tópicos convidados a ler as revisões de Zhang et al. (2019), Chen (2022) e Lismer e Kimmins (2023).

Atualmente, os fatores relativos ao ambiente em que o macho está sendo criado ou submetido, tais como a nutrição, local de alojamento e situações de estresse, são demonstrados como importantes moduladores do conteúdo molecular espermático (Sharma et al., 2016; Benito et al., 2018). Estas alterações causadas no conteúdo molecular espermático são reversíveis e herdáveis e afetam a expressão gênica sem que alterem a sequência do DNA, sendo classificadas como mecanismos epigenéticos. Atualmente, além do conteúdo molecular espermático, sabe-se que outros mecanismos epigenéticos presentes no espermatozoide interagem com o seu próprio conteúdo molecular. Desta maneira, nesta revisão abordaremos os principais mecanismos epigenéticos presentes nos espermatozoides, como estes mecanismos são regulados, e como eles podem impactar a fertilidade do macho e a saúde da progênie.

Mecanismos epigenéticos nos espermatozoides: epigenoma espermático

Em termos gerais, a epigenética se refere aos mecanismos herdáveis que estão além do DNA e que controlam a expressão gênica de forma a permitir que células com mesmo conteúdo genômico apresentem papéis e funções distintas no organismo. O prefixo de origem grega “epi” significa “acima de” e, portanto, a palavra epigenética exprime a ideia de “acima da genética” e assim representa uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética. De fato, a epigenética consiste em um conjunto de informações herdáveis que determinam os genes que devem ser ativados e/ou reprimidos permitindo a diferenciação celular e a existência de organismos multicelulares (Vines, 1998). Portanto, os mecanismos epigenéticos afetam a expressão gênica de forma herdável sem alterar a sequência do DNA. Os mecanismos epigenéticos clássicos consistem na metilação do DNA e nas modificações de histonas que desencadeiam modificações na estrutura da cromatina (Goldberg et al., 2007; Portela e Esteller, 2010). Além destes, atualmente incluem-se a regulação gênica por RNAs não codificadores, conhecidos por ncRNAs, dentre os quais se agrupam diversos tipos de RNAs, tais como os microRNAs (miRNAs), piwiRNAs (piRNAs), RNAs longos não codificadores (lncRNAs), fragmentos de RNA transportador derivados de pequenos RNAs (tsRNAs), dentre outros (Chen et al., 2016b; Sharma et al., 2016; Skvortsova et al., 2018).

Por serem células altamente especializadas, os espermatozoides apresentam diversos mecanismos

epigenéticos que são estabelecidos durante a diferenciação das células germinativas primordiais em espermatogônias e durante a espermatogênese (Godmann et al., 2010; Oikawa et al., 2020). Recentemente, esforços também têm sido feitos para identificar o estabelecimento de marcas epigenéticas nos espermatozoides após a formação nos testículos, isto é, durante o trânsito epididimário (Galan et al., 2021; Bedi et al., 2022; Chen et al., 2022b). Porém, mesmo que o espermatozoide apresente diferentes mecanismos epigenéticos, chamados aqui de epigenoma, espera-se que a maior parte destes, com exceção dos genes *imprinted*, por exemplo, seja apagado após a fecundação para que se estabeleça a totipotência embrionária necessária para o desenvolvimento. No entanto, atualmente tem sido demonstrado que alguns destes mecanismos escapam do ciclo de reprogramação que ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial e persistem, impactando nas características da progênie. A seguir serão abordados os principais mecanismos presentes no epigenoma espermático.

Metilação do DNA espermático

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético clássico mais estudado e descrito. Este mecanismo consiste na adição de grupo metil (-CH₃) no carbono 5' de citosinas que antecedem e se ligam às guaninas por fosfato (CpG), e que estão normalmente localizadas em regiões ricas em CpG. A metilação é catalisada por diferentes tipos de enzimas chamadas de DNA metiltransferases (DNMTs). Por outro lado, a desmetilação ocorre de maneira passiva, quando não há atividade de enzimas DNMT, ou de maneira ativa, mediante a ação de enzimas da família *ten-eleven translocation* (TET). De forma geral, a metilação desencadeia silenciamento gênico (Portela e Esteller, 2010; Skvortsova et al., 2018). Estima-se que o espermatozoide apresente 70% do DNA metilado, sendo, portanto, um mecanismo epigenético importante para a fertilidade masculina, uma vez que quando desregulado durante a espermatogênese está associado à azoospermia e ao perfil alterado de moléculas nas células germinativas (Revisado por Lismer e Kimmins, 2023). Após a aquisição das metilações, ao fecundar o ócito, o espermatozoide deve perder essas metilações para que novas marcas sejam adquiridas pelo embrião em formação. Com exceção dos genes *imprinted*, o DNA espermático é desmetilado ativamente pelas TETs, com destaque para a TET3, que é essencial para a desmetilação do DNA espermático (Gu et al., 2011; Ni et al., 2016).

Histonas, código de histonas e protaminação

As histonas são proteínas envoltas por fitas de DNA que formam o nucleossomo da cromatina, as quais possuem prolongamentos de aminoácidos (regiões aminoterminais), chamadas de caudas de histonas, que podem sofrer modificações pós-traducionais tais como: metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação (Dada et al., 2012). Essas modificações compõem o código de histonas e determinam a conformação da estrutura da cromatina contribuindo para modular a expressão gênica (Goldberg et al., 2007). Dessa forma, os códigos de histonas alteram a conformação da cromatina tornando-a mais (eucromatina) ou menos (heterocromatina) relaxada. Esta conformação mais ou menos relaxada da cromatina é que a torna acessível, ou não, à maquinaria de transcrição (Balhorn, 2007). No entanto, o espermatozoide possui poucas histonas em sua cromatina. Estima-se que ao fim da espermatogênese, cerca de 10% de histonas remanescentes permaneçam na célula espermática. Em espermatozoides murinos, estima-se a presença de 1 a 8 % de histonas remanescentes, enquanto em espermatozoides humanos estima-se de 2 a 15% (Brykczynska et al., 2010; Erkek et al., 2013; Yamaguchi et al., 2018). Estas histonas que permanecem na célula espermática foram relacionadas com o desenvolvimento embrionário em humanos por contribuírem com a formação da heterocromatina do pronúcleo masculino (H3K9me3) (van de Werken et al., 2014) e abrigarem regiões de *clusters* de ncRNAs e genes importantes para o desenvolvimento (H3K4me3) (Ward, 2010; Hammoud et al., 2009; Brykczynska et al., 2010; Yamaguchi et al., 2018).

Ao fim da espermatogênese, na espermiogênese, há o remodelamento da cromatina havendo substituição das histonas (H2A, H2B, H3 e H4) por variantes e, em seguida, por proteínas nucleares de transcrição tipo 1 e 2 (TP1 e TP2) que, por sua vez, são substituídas pelas proteínas básicas de alta afinidade com o DNA, chamadas de protaminas P1 e P2 (Balhorn, 2007). Este processo, chamado de protaminação, é essencial para a proteção do DNA espermático e também para a diminuição do volume celular (Lismer e Kimmins, 2023). Para a estabilização da protaminação ocorre a fosforilação e desfosforilação das protaminas, além da formação das pontes de dissulfeto intermoleculares (Balhorn, 2007), que proporcionam que a cromatina do gameta masculino assuma a forma toroidal (i.e., extremamente compacta) (Ward, 2010) e se torne altamente estável (Balhorn, 2007). O processo de protaminação, por sua vez, é revertido após a fecundação por maquinaria presente no ócito que substitui rapidamente as protaminas por histonas

acetiladas (Lepikhov et al., 2008).

RNAs não codificadores e o código espermático de RNAs

Além dos mecanismos epigenéticos clássicos, um terceiro mecanismo epigenético deve ser contemplado no espermatozoide: a ação dos ncRNAs. Estes RNAs não codificam proteínas e desempenham papel crucial na regulação da expressão gênica, podendo silenciar ou modular a tradução de proteínas pós-transcricionalmente (Bartel, 2018). Além da regulação na expressão gênica, os estudos têm mostrado que essas moléculas podem ser transmitidas entre gerações e impactar em características da progênie (Zhang et al., 2019). Os ncRNAs são divididos em dois grupos: 1) lncRNAs, que são aqueles que possuem mais de 200 nucleotídeos (nts); e 2) RNAs pequenos não codificadores (Do inglês, *small non-coding RNAs*; sncRNAs), que são aqueles que possuem, em média, cerca de 18-30 nts (Zhang et al., 2019). Embora a célula espermática possua pouca quantidade de RNA, o perfil de RNAs presentes no espermatozoide é variado, incluindo tanto mRNAs (RNAs mensageiros) quanto ncRNAs, divididos em lncRNAs e sncRNAs. Nos espermatozoides, existem tipos de sncRNA que são importantes para os mecanismos de regulação gênica na fertilidade do macho, a saber: piRNAs, tsRNAs, miRNAs e, mais recentemente, os fragmentos de RNA ribossômico (rsRNAs) (Chen et al., 2016b; Zhang et al., 2019; Chen, 2022).

Durante a espermatogênese, os piRNAs que possuem aproximadamente 20-30 nts, são importantes pois silenciam a expressão de elementos transponíveis por meio de metilação do DNA para a manutenção da estabilidade gênica (Siomi et al., 2011). Por outro lado, após a formação dos espermatozoides nos testículos, estes chegam aos epidídimos e apresentam majoritariamente conteúdo de tsRNAs e rsRNAs e, em menor escala, uma grande variedade de miRNAs. Estas moléculas de RNA podem variar durante o trânsito epididimário por meio da perda do conteúdo da gota citoplasmática, da fragmentação de RNAs no espermatozoide e aquisição de moléculas pela interação com as vesículas extracelulares epididimárias (Sharma et al., 2016; Chen, 2022). Ainda, para tornar todo o processo mais complexo, os sncRNAs presentes nos espermatozoides possuem modificações de RNAs (Zhang et al., 2018). Além disso, alterações na espermatogênese que desregulam a metilação e código de histonas do DNA espermático se relacionam com a carga de RNA espermática, estando estes eventos todos em íntima relação (Ben Maamar et al., 2018). Ainda, o código espermático de RNAs pode impactar características embrionárias e da progênie, perfazendo um mecanismo importante para a aquisição de marcas epigenéticas pelo embrião.

Código espermático de RNAs: peça chave do epigenoma do espermatozoide

Por possuírem mais técnicas disponíveis para mensuração, os sncRNAs espermáticos são os mais explorados principalmente no tocante à transmissão para a progênie. Porém, pela relação com outros mecanismos epigenéticos espermáticos, tem ficado cada vez mais claro que será necessária a melhor compreensão destes mecanismos como um todo e a interação entre eles para entender a modulação destes no espermatozoide. Têm sido descritas associações entre alterações na metilação e o código de histonas do espermatozoide com distúrbios no desenvolvimento embrionário e da progênie. Porém, pouco se entende como essas marcas poderiam persistir no pronúcleo masculino, que é desmetilado ativamente logo após a fecundação (Skvortsova et al., 2018; Wang et al., 2019). Até o momento tem sido mais explorado o papel dos sncRNAs e, principalmente dos miRNAs espermáticos, perfazendo grande parte das características espermáticas intrínsecas, que podem persistir no embrião mesmo que a reprogramação embrionária já tenha sido traçada.

De forma fascinante, o conteúdo de sncRNAs espermático pode ser modulado e sofrer influência do ambiente (Holliday, 2006; Alves et al., 2021). Esta modulação de conteúdo de RNAs ocorre durante a espermiogênese, no microambiente testicular; durante a maturação espermática, no microambiente epididimário; e durante o trânsito pós-epididimário (Boerke et al., 2007). Assim, nos testículos, fatores externos que impactam o fim da espermatogênese, especificamente a espermiogênese, podem alterar a metilação do DNA, o código de histonas e, portanto, a conformação do DNA espermático (Ben Maamar et al., 2018). Como há relação entre os processos, pode haver também alteração do conteúdo de sncRNAs espermáticos (Chen et al., 2016b). No trânsito epididimário, alterações que impactam os níveis de DNMT2 no epitélio epididimário, por exemplo, alteram de forma rápida o conteúdo molecular espermático (Zhang et al., 2018). Por fim, após passar pelo epidídimo, o conteúdo molecular dos espermatozoides é alterado pelo contato dessas células com o plasma seminal (Sullivan e Saez, 2013; Sullivan, 2015).

Embora o processo de espermatogênese seja fundamental para a modulação do conteúdo molecular espermático, a maturação espermática no epidídimo destaca-se por modular o conteúdo intrínseco

espermático após a formação da célula espermática, sendo processo dinâmico e rápido e sem estar associado necessariamente às alterações dos atributos espermáticos morfofuncionais. No entanto, existem diversos mecanismos de interação do espermatozoide com o epidídimo, o que torna a modulação do conteúdo molecular espermático complexa (Chen et al., 2016b; Chen et al., 2022a). No contexto dessas interações, destacam-se a comunicação dos espermatozoides com prolongamentos citoplasmáticos das células principais presentes no epitélio epididimário até mecanismos ainda pouco compreendidos, e recentemente descritos, tais como a interação do espermatozoide com axopódios, cílios primários e vesículas extracelulares (VEs) (Revisado em Chen et al., 2022a).

Dentre esses novos mecanismos de comunicação entre os espermatozoides e células somáticas epididimárias, a interação dos espermatozoides com VEs liberadas pelas células principais e claras do epitélio epididimário tem sido melhor estabelecida (Revisado em Chen et al., 2022a). As VEs se distinguem em dois grandes grupos: os exossomos e as microvesículas. Os exossomos são menores, com menos de 200nm de diâmetro, e ganham destaque por terem seu conteúdo regulado pela célula de origem. No epidídimo, estes são chamados de epididimossomos e possuem papel essencial na maturação espermática (Frenette et al., 2010; Belleannée et al., 2013; Sullivan et al., 2013). As moléculas entregues pelos epididimossomos aos espermatozoides já foram descritas como importantes para o desenvolvimento embrionário inicial e saúde da prole (Wang et al., 2011; Chan et al., 2020). Recentemente a interação de espermatozoides com VEs do plasma seminal impactou positivamente as taxas de produção de embriões em bovinos (Lange-Consiglio et al., 2022). Dados em andamento do nosso grupo ainda não publicados também têm mostrado melhora nas taxas de produção de embrião ao promover interação de VEs do fluido epididimário com espermatozoides. Dessa forma, as VEs, em conjunto com a metilação do DNA e código espermático de histonas, parecem ser importantes moduladoras dos mecanismos epigenéticos ligados ao conteúdo molecular dos espermatozoides e juntos responsáveis por gerar o código espermático de RNAs.

Código espermático de RNAs: impacto na fertilidade e na saúde da progênie.

Embora o espermatozoide possua vasto repertório de *sncRNAs*, atualmente os mecanismos epigenéticos espermáticos baseados em *miRNAs* são os mais estudados. O mecanismo de ação destas pequenas moléculas de RNA com cerca de 18 a 22 nts consiste, basicamente, na sua ligação à região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA-alvo e consequente inibição da expressão gênica de forma pós-transcricional (Bartel, 2018). Além destes, os *tsRNAs* e *rsRNAs* têm gerado grande repercussão, visto que são mais abundantes nos espermatozoides que os *miRNAs* e podem ser alterados no trânsito epididimário por diversos fatores (Revisado por Chen et al., 2022a). Assim, forma-se o código espermático de RNAs que é complexo e capaz de impactar tanto características do desenvolvimento embrionário inicial quanto da progênie.

Ainda há muitas lacunas sobre a ação do código espermático de RNAs no desenvolvimento embrionário. A hipótese mais aceita até o momento é que o código espermático de RNAs é transformado em código ribossomal embrionário que parece ser amplificado por mecanismos não bem compreendidos no embrião (Zhang et al., 2019). Em paralelo, as moléculas de RNAs também parecem ser amplificadas ao serem entregues ao embrião (Champroux et al., 2023). Dessa forma, esses mecanismos, em conjunto, fazem com que o código espermático de RNAs não sofra reprogramação sendo mantido após a ativação do genoma embrionário, e possa assim impactar características da prole. Embora sejam hipóteses, a transmissão do código espermático de RNAs parece ultrapassar a base corrente de conhecimento sobre o desenvolvimento embrionário inicial, a qual considera o apagamento das marcas epigenéticas paternas e reprogramação celular. Até o momento, somente genes *imprinted* e alguns elementos transponíveis foram descritos como não sendo reprogramados no embrião inicial (Wang et al., 2019; Lismer e Kimmins, 2023). Associado a isso, outro mecanismo que vem sendo demonstrado, é a possível herança de histonas remanescentes espermáticas, sendo que modificações da histona H3, tais como H3K27me3, H3K4me2 e H3K4me3 espermáticas, têm sido discutidas como resistentes à reprogramação epigenética pré-implantacional e transmitidas para o embrião (Skvortsova et al., 2018; Oikawa et al., 2020; Lismer e Kimmins, 2023).

Alguns *miRNAs* de origem espermática, como o *miR-34c*, *miR-449b* e *miR-216b* já foram descritos como importantes no desenvolvimento embrionário inicial por impactar as taxas de clivagem de murinos (Liu et al., 2012) e bovinos (Wang et al., 2017; Alves et al., 2019). No entanto, os níveis destes *miRNAs* foram detectados antes da reprogramação e da ativação do genoma embrionário. Interessantemente, outras moléculas, incluindo *miRNAs* e também *tsRNAs* já foram associadas com impacto em características da progênie. Os *miR-212/132*, por exemplo, entregues pelo espermatozoide ao embrião, foram associados com alterações de características cognitivas da prole (Benito et al., 2018). Da

mesma forma, diferentes níveis de tsRNAs de origem espermática foram associados com distúrbios metabólicos, como resistência à insulina e intolerância à glicose, na prole (Chen et al., 2016a). Assim, a formação do código espermático de RNAs é capaz de modular a saúde da prole.

Por fim, há grande expectativa em entender melhor quais moléculas são transmitidas pelos espermatozoides ao oócito. Dados do nosso grupo mostram que do total de 345 moléculas de miRNAs investigadas nos espermatozoides de seis touros e em três *pools* de cinco oócitos maturados *in vitro* advindo de diferentes fêmeas bovinas, 32 miRNAs são exclusivamente detectados nos espermatozoides e poderiam potencialmente serem entregues pelo espermatozoide ao embrião e impactar o desenvolvimento (Figura 1). Neste sentido, dados recentes do nosso grupo, em publicação, demonstram que moléculas entregues pelo espermatozoide ao oócito no momento da fecundação regulam mecanismos relacionados à transcrição, o que poderia indicar atuação na qualidade da ativação do genoma embrionário.

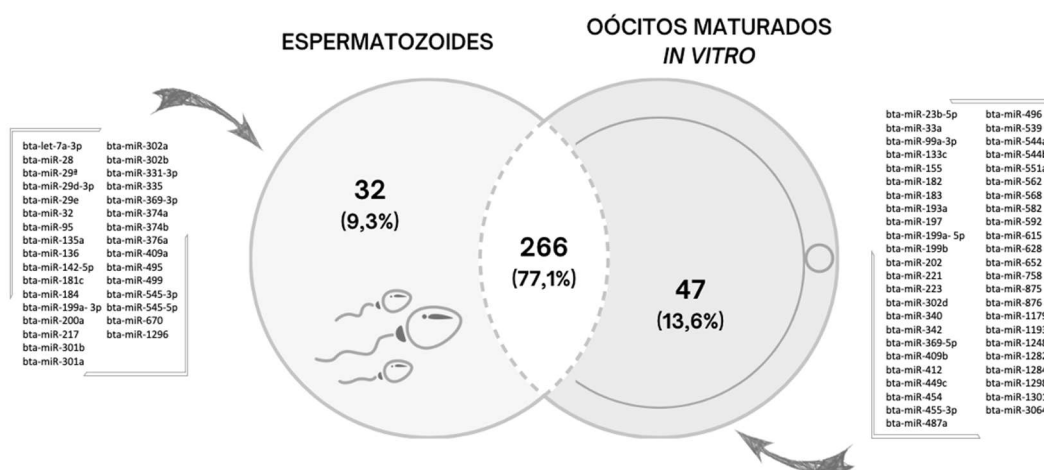


Figura 1. Diagrama de Venn do painel de 345 miRNAs detectados em espermatozoides e oócitos maturados *in vitro* de bovinos.

Considerações finais

Além dos mecanismos epigenéticos serem necessários para o estabelecimento da função da célula espermática, formam também o epigenoma espermático. Estes mecanismos possuem intensa interação e culminam na formação do perfil intrínseco de moléculas espermáticas, chamado de código espermático de RNAs, que pode ser alterado por fatores externos, principalmente pela interação dos espermatozoides com as vesículas extracelulares. O código espermático de RNAs pode influenciar o desenvolvimento embrionário inicial e a saúde da prole por mecanismos ainda não muito bem compreendidos. Entretanto, fica evidente que a regulação do conteúdo molecular seja ela durante a espermatogênese ou após, pode impactar características da progênie e, portanto, a fertilidade masculina, mesmo que não afete características espermáticas morfofuncionais. Além disso, a descoberta de novos mecanismos moleculares envolvidos na fertilidade masculina tem permitido o esclarecimento das causas de infertilidade, até então consideradas idiopáticas, possibilitando, assim, que novos métodos de diagnósticos sejam estabelecidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido para F.P. (Processo FAPESP 21/08759-2) e E.C.C.C. (Processo FAPESP 16/05395-1) e pelas bolsas de pesquisa concedidas para M.B.R.A. (Processo FAPESP 19/23685-5 e 15/09154-6) e à CAPES pela bolsa de doutorado à A.B.B.M. (CAPES 88887.749750/2022-00).

Referências

Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.13, n.37, p.1-9, 2015.

- Alves MBR, Arruda RP, Batissaco L, Garcia-Oliveros LN, Gonzaga VH, Nogueira VJM, Almeida FS, Pinto SCC, Andrade GM, Perecin F, Da Silveira JC, Celeghini ECC.** Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. *Theriogenology*, v.161, p.26-40, 2021.
- Alves MBR, Celeghini ECC, Belleannée C.** From sperm motility to sperm-borne microRNA signatures: new approaches to predict male fertility potential. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.8, p.791, 2020.
- Alves MBR, De Arruda RP, De Bem THC, Florez-Rodriguez SA, Filho MFS, Belleannée C, Meirelles FV, Da Silveira JC, Perecin F, Celeghini ECC.** Sperm-borne miR-216b modulates cell proliferation during early embryo development via K-RAS. *Scientific Reports*, v.9, n.1, p.10358, 2019.
- Balhorn R.** The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, v.8, n.9, p.227, 2007.
- Bartel DP.** Metazoan MicroRNAs. *Cell*, v.173, n.1, p.20-51, 2018.
- Bedi YS, Roach AN, Thomas KN, Mehta NA, Golding MC.** Chromatin alterations during the epididymal maturation of mouse sperm refine the paternally inherited epigenome. *Epigenetics Chromatin*, v.15, n.2, p.2-14, 2022.
- Belleannée C, Calvo É, Caballero J, Sullivan R.** Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biology of Reproduction*, v.89, p.30, 2013.
- Benito E, Kerimoglu C, Ramachandran B, Pena-Centeno T, Jain G, Stilling RM, Islam MR, Capece V, Zhou Q, Edbauer D, Dean C, Fischer A.** RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after Environmental Enrichment. *Cell Reports*, v.23, n.2, p.546-554, 2018.
- Ben Maamar M, Sadler-Riggelman I, Beck D, McBirney M, Nilsson E, Klukovich R, Xie Y, Tang C, Yan W, Skinner MK.** Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA expression, and histone retention mediate vinclozolin-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environmental Epigenetics*, v.4, n.2, 2018.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM.** A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v.68, p.147-55, 2007.
- Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Peters AHFM.** Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature Structural & Molecular Biology*, v.17, p.679-687, 2010.
- Champroux A, Yang T, Dickson DA, Meng A, Harrington A, Liaw L, Marzi M, Nicassio F, Schlaeger TM, Feig LA.** Preimplantation embryos amplify sperm-derived miRNA levels to mediate transgenerational epigenetic inheritance. *BioRxiv*, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2023.04.21.537854>> Acesso em: 3 maio 2023.
- Chan JC, Morgan CP, Leu NA, Shetty A, Cisse YM, Nugent BM, Morrison KE, Jašarević E, Huang W, Kanyuch N, Rodgers AB, Bhanu NV, Berger DS, Garcia BA, Ament S, Kane M, Epperson CN, Bale TL.** Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment. *Nature Communications*, v.11, n.1, p.1499, 2020.
- Chen H, Alves MBR, Belleannée C.** Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. *Human Reproduction Update*, v.28, n.1, p.55-66, 2022a.
- Chen H, Scott-Boyer MP, Droit A, Robert C, Belleannée C.** Sperm Heterogeneity Accounts for Sperm DNA Methylation Variations Observed in the Caput Epididymis, Independently From DNMT/TET Activities. *Frontier in Cell and Developmental Biology*, v.10, n.834519, p.1-17, 2022b.
- Chen, Q.** Sperm RNA-mediated epigenetic inheritance in mammals: Challenges and opportunities. *Reproduction, Fertility and Development*, 2022.
- Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng G-H, Peng H, Zhang X, Zhang Y, Qian J, Duan E, Zhai Q, Zhou Q.** Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, v.351, n.6271, p.397-400, 2016a.
- Chen Q, Yan W, Duan E.** Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nature Reviews Genetics*, v.17, n.12, p.733-743, 2016b.
- Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernández JL, Gosálvez J, Agarwal A.** Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.29, p.213-223, 2012.
- Erkek S, Hisano M, Liang CY, Gill M, Murr R, Dieker J, Peters AHFM.** Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nature Structural & Molecular Biology*, v.20, n.7, p.868-875, 2013.
- Frenette G, Girouard J, D'Amours O, Allard N, Tessier L, Sullivan R.** Characterization of two distinct populations of epididymosomes in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis. *Biology of Reproduction*, v.83, n.3, p.473-480, 2010.

- Galan C, Serra RW, Sun F, Rinaldi VD, Conine CC, Rando OJ.** Stability of the cytosine methylome during post-testicular sperm maturation in mouse. *PLoS Genetics*, v.17, n.3, 2021.
- Godmann M, May E, Kimmins S.** Epigenetic mechanisms regulate stem cell expressed genes *Pou5f1* and *Gfra1* in a male germ cell line. *PLoS One*, v.5, n.9, p.1-17, 2010.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E.** Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, v.128, n.4, p.635–638, 2007.
- Gu T-P, Guo F, Yang H, Wu H-P, Xu G-F, Liu W, Xu G-L.** The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, v.477, n.7366, p.606–610, 2011.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR.** Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, v.460, n.7254, p.473–478, 2009.
- Holliday R.** Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics*, v.1, n.2, p.76–80, 2006.
- Kovac JR, Addai J, Smith RP, Coward RM, Lamb DJ, Lipshultz LI. The effects of advanced paternal age on fertility. *Asian Journal of Andrology*, v.15, n.6, p.723-728, 2013.
- Lange-Consiglio A, Capra E, Monferrini N, Canesi S, Bosi G, Cretich M, Frigerio R, Galbiati V, Bertuzzo F, Cobalchini F, Cremonesi F, Gasparrini B.** Extracellular vesicles from seminal plasma to improve fertilizing capacity of bulls. *Reproduction and Fertility*, v.3, n.4, p.313–327, 2022.
- Lepikhov K, Zakhartchenko V, Hao R, Yang F, Wrenzycki C, Niemann H, Wolf E, Walter J.** Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics Chromatin*, v.1, n.8, p.1-11, 2008.
- Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, Swan SH.** Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update*, v.23, n.6, p.646-659, 2017.
- Lisner A, Kimmins S.** Emerging evidence that the mammalian sperm epigenome serves as a template for embryo development. *Nature Communications*, v.14, n.2142, p.1-22, 2023.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.109, n.2, p.490–494, 2012.
- Ni K, Dansranjavin T, Rogenhofer N, Oetzuerk N, Deuker J, Bergmann M, Schagdarsurengin U.** TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. *Human Reproduction*, v.31, n.7, p.1411–1424, 2016.
- Oikawa M, Simeone A, Hormanseder E, Teperek M, Gaggioli V, O’Doherty A, Falk E, Sporniak M, D’Santos C, Franklin VNR, Kishore K, Bradshaw CR, Keane D, Freour T, David L, Grzybowski AT, Ruthenburg AJ, Gurdon J, Jullien J.** Epigenetic homogeneity in histone methylation underlies sperm programming for embryonic transcription. *Nature Communications*, v.11, n.1, p.3491, 2020.
- Portela A, Esteller M.** Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, v.28, n.10, p.1057-1068, 2010.
- Rahman MS, Kwon W-S, Pang M-G.** Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v.84, n.9, p.749-759, 2017.
- Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Rando OJ.** Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, v.351, n.6271, p.391–396, 2016.
- Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA.** PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.4, n.12, p.246-258, 2011.
- Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O.** Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.19, n.12, p.774-790, 2018.
- Sullivan R.** Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian Journal Andrology*, v.17, p.726-772, 2015.
- Sullivan R, Saez F.** Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: Their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, v.146, n.1, p.21-35, 2013.
- Van de Werken C, van der Heijden G, Eleveld C, Teeuwssen M, Albert M, Baarends WM, Laven JSE, Peters AHFM, Baart EB.** Paternal heterochromatin formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone modifications. *Nature Communications*, v.5, p.5868, 2014.
- Vines G.** Hidden inheritance. *New Scientist*, v.2162, p.27-30, 1998.
- 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, C-Y Zhang C-Y, Zhang C.** Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clinical Chemistry*, v.57, n.12, p.1722-1731, 2011.
- Wang M, Gao Y, Qu P, Qing S, Qiao F, Zhang Y, Mager J, Wang Y.** Sperm-borne miR-449b influences

cleavage, epigenetic reprogramming and apoptosis of SCNT embryos in bovine. *Scientific Reports*, v.7, n.1, p.1–12, 2017.

Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*, v.16, n.1, p.30–36, 2010.

Wang Y, Liu Q, Tang F, Yan L, Qiao J. Epigenetic regulation and risk factors during the development of human gametes and early embryos. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v.20, p.21-40, 2019.

Yamaguchi K, Hada M, Fukuda Y, Inoue E, Makino Y, Katou Y, Okada Y. Re-evaluating the Localization of Sperm-Retained Histones Revealed the Modification-Dependent Accumulation in Specific Genome Regions. *Cell Reports*, v.23, n.13, p.3920–3932, 2018.

Yuan S, Zhan J, Zhang J, Liu Z, Hou Z, Zhang C, Yi L, Gao L, Zhao H, Chen ZJ, Liu J, Wu K. Human zygotic genome activation is initiated from paternal genome. *Cell Discovery*, 2023 v.9, n.13, p.1-17, 2023.

Zhang Y, Shi J, Rassoulzadegan M, Tuorto F, Chen Q. Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring. *Nature Reviews Endocrinology*, v.15, n.8, p.489-498, 2019.

Zhang Y, Zhang X, Shi J, Tuorto F, Li X, Liu Y, Liebers R, Zhang L, Qu Y, Qian J, Pahima M, Liu Y, Yan M, Cao Z, Lei X, Cao Y, Peng H, Liu S, Wang Y, Zheng H, Woolsey R, Quilici D, Zhai Q, Li L, Zhou T, Yan W, Lyko F, Zhang Y, Zhou Q, Duan E, Chen Q. Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nature Cell Biology*, v.20, n.5, p.535-540, 2018.

Zheng X, Li Z, Wang G, Wang H, Zhou Y, Zhao X, Cheng CY, Qiao Y, Sun F. Sperm epigenetic alterations contribute to inter-and transgenerational effects of paternal exposure to long-term psychological stress via evading offspring embryonic reprogramming. *Cell Discovery*, v.7, n.1, p.101, 2021.
