



Possibilidades do uso do RNA espermático como ferramenta na suinocultura

Possibilities of using sperm's RNA as a tool in pig farming

Lucio Pereira Rauber

Instituto Federal Catarinense, campus Concórdia, SC

Resumo

A seleção de macho mais férteis é essencial para a suinocultura moderna, a análise do transcriptoma espermático tem se mostrado como uma ferramenta interessante para podermos escolher animais com maior potencial de fertilidade ou congelabilidade de sêmen. O objetivo da presente revisão foi caracterizar os RNA encontrados em espermatozoides suínos e apresentar possíveis finalidades de seu uso na suinocultura. Por sofrer mudanças estruturais significativas, como meiose, compactação do DNA e perda de parte do citoplasma, as linhagens celulares que dão origem aos espermatozoides também apresentam uma população singular na população RNA. Os espermatozoides carregam um transcriptoma heterogêneo, com mRNA e muitos pequenos RNA truncados e de difícil avaliação. Eventos como congelamento, capacitação e estresse térmico causam alteração nos perfis de RNA espermático. Existem RNA que podemos relacionar como marcadores moleculares para diversas funções, além disso, há muitas evidências de que o RNA espermático contribua na modulação gênica durante a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, tornando estes em um importante alvo para estudos futuros.

Palavras-chave: Transcriptoma, espermatozoide, cachaço

Abstract

The selection of fertile males is essential for modern pig farming, the sperm transcriptome analysis has been shown to be an interesting tool to be able to choose animals with greater fertility potential or semen freezeability. The aim of this review was to characterize the RNA found in boar spermatozoa and to present possible purposes for its use in pig farming. By undergoing significant structural changes, such as meiosis, DNA compaction and loss of part of the cytoplasm, spermatid cells also have a unique population in the RNA population. Sperm carry a heterogeneous transcriptome, with mRNA and many small and truncated RNAs. Events such as freezing, capacitation and heat stress cause changes in sperm RNA profiles. There are RNAs that we can relate as molecular markers for several functions, in addition, there is evidence that sperm RNA contributes to gene modulation during fertilization and early embryonic development, making these an important target for future studies.

Keywords: Transcriptome, spermatozoa, boar

Introdução

A inseminação artificial tem papel significativo na suinocultura moderna, onde quase 95% das matrizes comerciais são inseminadas (Viana et al., 2020). As Unidades de Difusão Genética (UDG) ficam com a responsabilidade de fornecer o sêmen para fertilizar milhares de porcas e a redução de fertilidade de um reprodutor pode causar um impacto enorme na cadeia produtiva. Identificar precocemente esses machos é uma necessidade e uma difícil tarefa. Apesar das avaliações pelos métodos tradicionais, que envolvem a cinética e morfologia dos espermatozoides, serem eficientes, ainda assim pode deixar passar algum reprodutor subfêtil (Málaga et al., 2021).

Os sistemas tipo CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) são, na prática de laboratório, ferramentas valiosas nas decisões relativas à rejeição ou não do ejaculado (Broekhuijse et al., 2012) e estão presente em praticamente todas centrais de processamento de sêmen. Já ferramentas mais complexas têm disponibilidade limitada e ficam restritas aos centros de pesquisa e universidades, como as avaliações pela produção *in vitro* de embriões (Sellés et al., 2003), análise de integridade do DNA (Ausejo et al., 2021), integridade de membrana e organelas (Jung et al., 2015) ou proteômica (Kwon et al., 2015), por exemplo. Mas nossas dúvidas não se limitam só à infertilidade ou subfertilidade,

¹Correspondência: lucio.rauber@ifc.edu.br

Recebido: 08 de setembro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



gostaríamos de ter acesso rápido e prático aos melhores machos para congelar sêmen (Fraser et al., 2020), ou para emprego na fertilização *in vitro* sem causar polispermia (Rauber, 2008) ou ainda desenvolver novas técnicas para sexagem de sêmen (Keles et al., 2021).

Na última década aumentou o interesse em estudos dos perfís de RNA espermático, indicando que estes não sejam simples resíduos da espermatogênese mas que tenham uma função prática. Os espermatozoides contêm vários mRNA intactos, completos e degradados que estão, provavelmente, relacionados às funções como compactação do DNA, capacitação espermática ou modulação do desenvolvimento embrionário inicial (Fraser et al., 2020). Dadoune (2009) trabalha com a hipótese de que, ao menos em humanos e camundongos, os RNA dos espermatozoides possam estar envolvidos na transmissão de informações epigenéticas para a prole. Então, o objetivo do presente artigo é caracterizar os RNA encontrados em espermatozoides suínos e apresentar possíveis finalidades de seu uso na suinocultura.

A Transcrição

O dogma central da biologia molecular trata do fluxo das informações genéticas, de como o DNA pode formar uma proteína. Na primeira etapa desse processo, o DNA é transcrito em RNA por enzimas RNA polimerase. Os mRNA produzidos são processados e transportados para fora do núcleo onde são traduzidos em proteínas pelos ribossomos. Entretanto, a maior parte dos RNA sintetizados não codificam proteínas, sendo chamados os *non-coding* RNA (ncRNA) e estão inclusos nessa classe os RNA ribossomais, transportadores e uma população variada de pequenos RNA (Li et al., 2018; Fraser et al., 2020). Transcriptômica é a ciência que estuda o transcriptoma ou transcritoma, que se refere à população de RNA de uma célula ou tecido em um determinado momento ou estado físico. Atualmente, a RNA-seq é a tecnologia de preferência para a análise do transcriptoma, que é essencial para compreender a base molecular dos fenótipos e que pode ser aplicada à pesquisa pecuária (Gòdia et al., 2018).

Quando falamos de espermatozoides, devemos lembrar de todas as mudanças celulares que ocorrem durante a espermatogênese, da transformação da espermatogônia, uma célula grande e redonda, em um espermatozoide, compacto e quase sem citoplasma. Essas transformações envolvem a meiose, a troca das histonas por protaminas, onde o DNA é enrolado (Dadoune, 2009) e a perda do citoplasma com grande parte das organelas (Parvinen, 2005). O início da meiose faz com que não sejam transcritos novos RNA e que vários remanescentes sejam perdidos junto com a gota citoplasmática (Rauber, 2013), o que dá aos espermatozoides características particulares.

Como extrair o RNA dos espermatozoides

Os espermatozoides utilizados podem ser oriundos de sêmen fresco, de doses comerciais para a inseminação artificial ou mesmo de sêmen congelado. O primeiro passo é a remoção do diluente por centrifugação e ressuspensão em solução salina. Antes de iniciar a extração o sêmen pode ser tratado com uma solução de 0,5% de Triton X-100 (Roche, Germany) para eliminar a contaminação de células somáticas (Rauber, 2008), apesar de não ser um consenso em função dos danos que possa causar à membrana dos espermatozoides (Mao et al., 2013). Métodos como a migração ascendente (*swim-up*) ou gradiente de Percoll® não são aconselhados por excluírem células mortas, defeituosas ou com baixa motilidade, podendo influenciar o objetivo da pesquisa, claro que estas técnicas podem ser aplicadas conforme o objetivo do estudo em questão. O número inicial de espermatozoides para extração gira em torno de 100 a 150x10⁶ (Zeng et al., 2014; Fraser et al., 2017; Li et al. 2018; Dai et al., 2019; Fraser et al., 2020; Pedrosa et al., 2021). O método mais empregado para a extração do RNA espermático é o TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.), baseado no uso de fenol e clorofórmio, com poucas modificações entre os grupos de pesquisa. Após a extração, é importante o tratamento com Dnase I para eliminar possíveis contaminações por DNA, e então, é avaliada a concentração e a qualidade do RNA, geralmente por espectrofotômetro e eletroforese, respectivamente.

Caracterização

A quantidade de RNA recuperada de espermatozoides é de aproximadamente 5 a 10ng por milhão de células, similar entre as diferentes espécies, mas 1.000 vezes menor do que a isolada de células somáticas (Rauber, 2013). Isto se torna um empecilho já que a maior parte das técnicas empregadas em estudos requerem uma quantidade inicial de aproximadamente 1 µg de RNA de boa qualidade, para tanto,



usar um *kits* projetado para trabalhar com RNA de baixa qualidade é essencial (Gòdia et al., 2018).

Outra característica marcante é que espermatozoides não possuem, ou possuem muito pouco, RNA ribossomais (Fraser et al., 2017), não formando as bandas do 28S e 18S no gel de eletroforese. Inclusive, esta característica pode ser utilizada para avaliar se houve contaminação da amostra por células somáticas. Mesmo sem rRNA, sugere-se que alguns transcritos possam ser traduzidas nas mitocôndrias durante a capacitação (Gur e Breitbart, 2006).

O transcriptoma espermático é composto por mRNA intactos de cadeia longa, entre 1.500 e 1.800bp e grande quantidade de pequenos RNA, menores que 250 bp (Fraser et al., 2017), que podem ter alguma função ou ser simplesmente RNA degradado. Gòdia et al. (2019), encontraram mais de 31.000 transcritos codificadores de proteínas mas a maioria deles estava altamente fragmentada. Estas fragmentações não seguiam um padrão conhecido, entretanto, os autores sugeriram potenciais implicações funcionais, já que esses fragmentos de RNA não traduzem proteínas mas fazem parte dos ncRNA e uma fração deles ainda podem ser microRNAs (miRNAs), que regulam a expressão genica pós-transcricional, ou RNA de interação com DNA (piwiRNA). Cada vez mais há evidências de que os espermatozoides contêm uma população complexa de miRNA que podem estar relacionadas à fertilidade, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. MiRNA estão envolvidos na regulação de aproximadamente um terço de todos os genes de mamíferos (Reza et al., 2019), por isso, essa população tem chamado muito a atenção de vários pesquisadores, principalmente devido ao seu uso potencial como biomarcadores de fertilidade (Keles et al., 2021).

Como trabalhar com o RNA

Existem, atualmente, duas formas de se trabalhar com o RNA espermático, a primeira é focada nos mRNA, que podem gerar uma proteína, e a segunda mira nos pequenos RNA, que podem atuar no controle da expressão gênica. O estudo também pode avaliar RNA específicos, de forma independente ou em conjunto na forma de microarranjos.

Por suas características bioquímicas, inerentes as suas funções, os RNA são sensíveis e de fácil degradação. Então, após a extração, os RNA devem ser convertidos em um DNA complementar (cDNA) utilizando uma enzima transcriptase reversa (RT-PCR). Enzimas, nucleotídeos e *primers* randômicos são facilmente encontrados em *kits* comerciais para esta finalidade, também podem ser selecionados *primers* específicos que são adquiridos em empresas especializadas.

Tradicionalmente, o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) é usado, como o próprio nome diz, para quantificar a expressão gênica, nesses casos escolhe-se os mRNA dos genes alvos, já conhecidos, e avalia-se a concentração destes nas células. Por exemplo, transcritos como FOS, NFATC3, EAF2, BAMBI, PTPRU, PTPN2, ND6 e ACADM, foram indicados como marcadores potenciais da fertilidade de machos suínos (Fraser et al., 2020). Usando testes simples baseados em RT-PCR, Dadoune (2009) mostra que a quantidade de mRNA da protamina 1 (PRM1) foi significativamente maior em espermatozoides humano com baixa mobilidade do que nos com alta mobilidade. Embora o PCR quantitativo seja uma ferramenta útil, que fornece informações muito valiosas, esses estudos normalmente abordam a integridade do transcrito e têm como alvo um ou dois exons dos genes candidatos.

O RNA-seq supera essa limitação, pois é uma abordagem que fornece uma medição mais precisa dos níveis de transcritos e suas isoformas (Wang et al., 2009). Esta técnica permite avaliar pequenos fragmentos de RNA e pode revelar variações de sequência (SNP, por exemplo) das regiões transcritas e fornecer informações sobre como exons estão conectados, tornando o RNA-Seq útil para estudar transcriptomas complexos, como o de espermatozoides. O RNA-Seq do transcriptoma de espermatozoides suínos mostrou que a criopreservação compromete os níveis de expressão de microRNA que teriam como função proteger os espermatozoides das crioinjúrias (Zhang et al., 2017), e causou um aumento na expressão de genes específicos de espermatozoides em comparação com o sêmen fresco (Dai et al., 2019) que, segundo os autores, pode estar envolvido em importantes processos biológicos específicos, como na crioproteção, integridade e função de membrana, transporte de carboidratos e metabolismo celular.

As bibliotecas de RNA associadas aos microarranjos dos espermatozoides suínos são outras técnicas empregadas e que permitem o desenvolvimento de um catálogo de transcritos, determinando a estrutura transcricional dos genes e quantificando os níveis variáveis de expressão de cada transcrito. A tecnologia de microarranjos proporciona uma oportunidade única para avaliar as variações de transcritos de espermatozoides com diferentes características de fertilidade, ou com diferentes habilidades de



congelamento ou fertilização, por exemplo. Da mesma forma, hoje em dia existem microarranjos para os pequenos RNA (Zhang et al., 2017; Gòdia et al., 2019; Keles et al., 2021).

Status quo

Li e colaboradores (2018) apontam evidências de que a capacitação *in vitro* induz mudanças abrangentes nos padrões de expressão de miRNA e de seus mRNA alvo em sêmen suíno fresco e capacitado. Os níveis de alguns transcritos também mudam entre os ejaculados de verão e inverno, provavelmente respondendo ao estresse térmico, que por sua vez, causariam estresse oxidativo, danos à membrana e ao DNA espermático, resultando em autofagia (Gòdia et al., 2019).

A maioria dos artigos encontrados nas bases de dados abordam estudos sobre a congelabilidade de sêmen. Zeng et al. (2014) focaram na expressão de mRNA e proteína de marcadores epigenéticos (Dnmt3a, Dnmt3b, Jhdm2a, Kat8, Prm1, Prm2 e IGF2) durante a criopreservação de sêmen suíno, medida por qRT-PCR e ELISA, respectivamente. A epigenética se refere a mecanismos hereditários que ajudam a regular a expressão gênica sem mudanças reais nas sequências de DNA subjacentes e incluem modificações de histonas, RNA não codificantes e metilação de DNA. Embora mudanças dramáticas na expressão de mRNA de genes relacionados à epigenética tenham sido observadas antes e depois da criopreservação, o mesmo não foi verificado sobre os níveis de expressão das proteínas (Zeng et al., 2014). Os autores também sugerem que os crioprotetores pode alterar o perfil da expressão desses genes induzidas pelo congelamento.

Usando RNA-Seq, Fraser et al. (2020) identificaram vários genes que foram associados com inflamação e apoptose (FOS, NFATC3, ITGAL, EAF2 e ZDHHC14), espermatogênese (FGF-14 e BAMB1), autofagia (RAB33B), fosforilação de proteínas (PTPRU e PTPN2) e metabolismo energético (ND6 e ACADM), que foram predominantemente regulados para cima em machos com baixa congelabilidade em comparação com os do grupo alta congelabilidade. Estudos têm demonstrado que miRNA espermáticos associados à processos importantes como espermatogênese, processos de metabolismo energético, estrutura espermática, motilidade e apoptose também são diferencialmente expressados em cachacos com baixa congelabilidade (Zhang et al., 2017; Dai et al., 2019). Mais recentemente, Pedrosa et al. (2021) identificaram miRNA presentes em espermatozoides (ssc-miR-503) e em pequenas vesículas extracelulares do plasma seminal (ssc-miR-130a e ssc-miR-9) que podem indicar ejaculados com baixa capacidade de tolerar o processo de criopreservação.

Considerações finais

Baseado nessa revisão de literatura, podemos concluir que os espermatozoides carregam uma população heterogênea de RNA, com mRNA e muitos pequenos RNA truncados e de baixa qualidade ou transcricionalmente inertes. A quantidade recuperada é baixa devido ao pouco citoplasma que lhes restam. Eventos relacionados aos espermatozoides, como congelamento, capacitação e estresse térmico, causam alteração no transcriptoma espermático. Já se conhece RNA que podemos relacionar como possíveis marcadores moleculares para diversas funções, mas ainda precisam passar por mais validações para serem aplicados como rotina ou comercialmente. Além disso, há evidências de que o RNA espermático contribua na modulação gênica durante a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, tornando estes um importante alvo para estudos futuros.

Referências

- Ausejo R, Martínez JM, Soler-Llorens P, Bolarín A, Tejedor T, Falceto MV.** Seasonal Changes of Nuclear DNA Fragmentation in Boar Spermatozoa in Spain. *Animals*, v.11, n.465, 2021.
- Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella, BM.** Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J Anim Sci*, v.90, p.779–789, 2012.
- Dai DH, Qazi IH, Ran MX, Liang K, Zhang Y, Zhang M, Zhou GB, Angel C, Zeng CJ.** Exploration of miRNA and mRNA Profiles in Fresh and Frozen-Thawed Boar Sperm by Transcriptome and Small RNA Sequencing. *Int J Mol Sci*, v.20, n.802, 2019.
- Dadoue J-P.** Spermatozoal RNAs: What About Their Functions? *Microsc Res Tech*, v.72, p.536–551, (2009).
- Fraser L, Brym P, Pareek CS.** Isolation of total ribonucleic acid from fresh and frozen-thawed boar semen and its relevance in transcriptome studies. *South African Journal of Animal Science*, v.47, n.1,



2017.

Fraser L, Brym P, Pareek CS, Brzozowska MM, Pauksto L, Jastrzebski JP, Sakowska KW, Mankowska A, Sobiech P, Zukowski K. Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq. *Theriogenology*, v.142, p.400-413, 2020.

Gòdia M, Mayer FQ, Nafissi J, Castelló A, Rodríguez-Gil JE, Sánchez A, Clop A. A technical assessment of the porcine ejaculated spermatozoa for a sperm-specific RNA-seq analysis. *Syst Bio In Repro Med*, v.64, n.4, p.291-303, 2018.

Gòdia M, Estill M, Castelló A, Balasch S, Rodríguez-Gil JE, Stephen A. Krawetz, Sánchez A, Clop A. A RNA-Seq Analysis to Describe the Boar Sperm Transcriptome and Its Seasonal Changes. *Front Genet*, v.10, n.299, 2019.

Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, v.20, p.411-416, 2006.

Jung M, Rüdiger K, Schulze M. In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility. *Reprod Dom Anim*, v.50, s.2, p.20-24, 2015.

Keles E, Malama E, Bozukova S, Siuda M, Wyck S, Witschi U, Bauersachs S, Bollwein H. The micro-RNA content of unsorted cryopreserved bovine sperm and its relation to the fertility of sperm after sexsorting. *BMC Genomics*, v.22, n.30, 2021.

Kwon WS, Oh SA, Kim YJ, Rahman MS, Park Y-J, Pang MG. Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Sci Rep*, v.5, n.13821, 2015.

Li Y, Li R-H, Ran M-X, Zhang Y, Liang K, Ren Y-N, Cheng W, Zhang M, Zhou G-B, Qazi IH, Zeng C-J. High throughput small RNA and transcriptome sequencing reveal capacitation-related microRNAs and mRNA in boar sperm. *BMC Genomics*, v.19, n.736, 2018.

Málaga FC, Marques MG, Rauber LP, Siqueira HA, Peripolli V, Schwegler E, Oliveira Junior JM, Bianchi I. Como identificar machos subfêrteis. *Suinocultura Industrial*, p.14-16, 2021.

Mao S, Goodrich RJ, Hauser R, Schrader SM, Chen Z, Krawetz SA. Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. *Syst Biol Reprod Med*, v.59, p.287-295, 2013.

Parvinen M. The chromatoid body in spermatogenesis. *Int J Androl*, v.28, p.189-201, 2005.

Pedrosa AC, Torres MA, Alkmin DV, Pinzon JEP, Martins SMMK, da Silveira JC, Andrade AFC. Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. *Theriogenology*, v.174, p.60-72, 2021.

Rauber LP. *Qualitative and quantitative analysis of porcine sperm transcripts and characterization of a normalized cDNA library.* 2008. 106f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Ludwig-Maximilians Universität, Munique, 2008.

Rauber LP. RNA espermático, uma visão holística. *Rev Bras Reprod Anim*, v.37, n.4, p.309-317, 2013.

Reza AMMT, Choi Y-J, Han SG, Song H, Park C, Hong K, Kim J-H. Roles of microRNAs in mammalian reproduction: from the commitment of germ cells to peri-implantation embryos. *Biol Rev*, v.94, p.415-438, 2019.

Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. Analysis of In vitro Fertilizing Capacity to Evaluate the Freezing Procedures of Boar Semen and to Predict the Subsequent Fertility. *Reprod Dom Anim*, v.38, p.66-72, 2003.

Viana, CH, Jorge Neto, PN, Marques, MG. Inseminação artificial em suínos no Brasil: Biotecnologias e atualidades do mercado. *Suinocultura Industrial*, v.03, p.16-21, 2020.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, v.10, n.1, p.57-63, 2009.

Zeng C, Peng W, Ding L, He L, Zhang Y, Fang D, Tang K. A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, v.69, p.119-127, 2014.

Zhang Y, Dai D, Chang Y, Li Y, Zhang M, Zhou G, Peng Z, Zeng C. Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression. *Cryobiology*, v.76, p.24-33, 2017.
