

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/07/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

EFEITOS DA OSTEOPONTINA NO SÊMEN SEXADO BOVINO

VIVIANA VALLEJO ARISTIZÁBAL

Botucatu - SP

Agosto/2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

EFEITOS DA OSTEOPONTINA NO SÊMEN SEXADO BOVINO

VIVIANA VALLEJO ARISTIZÁBAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, para obtenção do título de doutora.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior

Coorientadora: Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Botucatu – SP
Agosto/2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vallejo Aristizabal, Viviana Helena.

Efeitos da osteopontina no sêmen sexado bovino /
Viviana Helena Vallejo Aristizabal. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antônio Dell'Aqua Junior

Coorientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Fertilização in vitro. 3.
Sêmen. 4. Osteopontina. 5. Citometria de fluxo. 6.
Biotecnologia animal.

Palavras-chave: Capacitação; Explante; Fertilização;
Viabilidade.

Nome do autor (a): Viviana Vallejo Aristizábal

Título: EFEITO DA OSTEOPONTINA NO SÊMEN SEXADO BOVINO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- UNESP,
Botucatu/SP.

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- UNESP,
Botucatu/SP.

Profa Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- UNESP,
Botucatu/SP.

Dra. Midyan Daroz Guastali

Membro

Dra. Raquel Zaneti Puelker

Membro

Data:

2 de julho 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Jose Antônio Dell'aqua Junior e minha coorientadora Fabiana Ferreira de Souza, pela paciência e competência na minha orientação e pelo exemplo profissional e pessoal.

Ao professor João Carlos Ferreira, pela amizade, pelo incentivo acadêmico, pelo exemplo de profissional e por cada oportunidade que tive compartilhada com a equipe dele onde aprendi muito.

A professora Fernanda Landim, por ceder gentilmente seu laboratório para a realização do meu projeto e estar sempre disposta a ajudar.

A cada um dos professores que me permitiram participar das aulas, pelos ensinamentos acadêmicos e a amizade.

Ao Neilson de relações estrangeiras pelo carinho, apoio e os conselhos dados.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e ao Departamento de Reprodução Animal, por tornar possível a realização do curso de mestrado e doutorado.

Ao programa PEC-PG (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos no Brasil.

Aos meus queridos amigos de reprodução Carol Scott, Carol Destro, Marcos Gomides, Kelry, Fernando Evaristo, Kit kat, Otávio, Michele, Rúbia e Lala. Por todos os momentos bons e ruins compartilhados, onde todos tivemos aprendizados tanto profissionais quanto emocional.

Ao frigorífico de Torrinha, Don José, o Médico Veterinário Dante e os integrantes da linha de abate, que se disponibilizaram para ajudar com a coleta dos úteros e que sempre estiveram dando ânimo para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amados pais, pelo incentivo constante e as forças para não desistir dos sonhos.

Aos meus familiares e amigos da Colômbia que sempre acreditaram em mim e os quais estiveram sempre dispostos a ajudar.

Os meus dois maiores amores “Nanin e Blosqui” que sempre tiveram a paciência necessária para aceitar todas minhas loucuras e meus estados de ânimo. Pelo apoio incondicional, pelos sorrisos que alegram cada um dos meus dias, por estarmos sempre unidos nos piores momentos. Impossível expressar todo meu amor e admiração por vocês dois.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Célula sexual masculina, o espermatozoide	4
2.2. Espermatozoides sexados	5
2.3. Capacitação espermática	7
2.4. Tuba uterina e o reservatório espermático	8
2.5. Fisiologia da fecundação	10
2.6. Osteopontina (OPN)	11
HIPÓTESES	14
OBJETIVO GERAL	14
Objetivos específicos	14
REFERÊNCIAS	15
ARTIGO	
Associação de espermatozoides bovinos com OPN melhora a produção in vitro de embriões	28

RESUMO

VALLEJO, A.V. EFEITOS DA OSTEOPONTINA NO SÊMEN SEXADO BOVINO. Botucatu - SP. 2018, p.53. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Tem sido relatado que altas concentrações de osteopontina (OPN) no plasma seminal de diversas espécies esta correlacionada com animais de alta fertilidade, identificando-a como bio marcador reprodutivo. De igual maneira estudos mostram uma maior taxa de fertilização *in vitro* quando é implementada nos meios para fertilização. Visto que a OPN pode ter funções antagônicas, o presente estudo visou identificar se suas funções são dose dependente, adicionando 4 diferentes concentrações de OPN sobre o sêmen sexado bovino por 30 minutos e avaliar por (i) citometria de fluxo a viabilidade, integridade de membrana e capacitação espermática; (ii) teste de ligação a células epiteliais da tuba uterina bovina (BOECs), para quantificar o numero de espermatozoides ligados às células epiteliais, formando o que seria *in vivo* o reservatório espermático e (iii) avaliar a produção de embriões *in vitro*. Na avaliação por citometria não foi observada uma interação da adição de OPN com os espermatozoides sexados e não sexados, diferente dos outros dois testes onde se evidenciou que independente da dose a OPN diminuiu a ligação dos espermatozoides às BOECs e a concentração de $0.5\text{g}/1 \times 10^6$ espermatozoides aumento a taxa de clivagem e formação de blastocistos. Isto ratifica o poder capacitante da OPN de 60KDa sobre os espermatozoides e confirma que esta, pode ter associações diretas com ambos gametos, gerando melhores taxas de fertilização *in vitro* e, por tanto, melhor desenvolvimento embrionário nos bovinos. No entanto, pelos resultados obtidos nos dois primeiros testes, acreditamos que a OPN precisa de um tempo de incubação superior a uma hora para conseguir saturação da glicoproteína nos espermatozoides e assim observar um efeito.

Palavra-chave: Viabilidade, explantes, fertilização, capacitação

ABSTRACT

VALLEJO, A.V. EFFECT OF OSTEOPONTIN ON SEX-SORTED BOVINE SPERM. Botucatu - SP. 2018, p. 53. Thesis (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

It has been reported that high concentrations of osteopontin (OPN) in the seminal plasma of diverse species is correlated with high fertility animals, identifying it as a bio-reproductive marker. Likewise studies show a higher rate of *in vitro* fertilization when it's implemented in fertilization media. Since OPN may have antagonistic functions, the present study aimed to identify if its functions are dose-dependent, adding four different concentrations of OPN on the sex-sorted and non-sorted bovine sperm for 30 minutes. The samples were evaluated by means of (i) flow cytometry the viability, membrane integrity and sperm capacitation; (ii) sperm-binding assay to BOECs, to quantify the number of sperm attached to the epithelial cells, forming what would be *in vivo* the spermatoc reservoir and (iii) to evaluate the *in vitro* embryo production. In flow cytometry an interaction of the addition of OPN with the sex-sorted and non-sorted sperm was not observed, different from the other two tests where it was evidenced that regardless of the dose, the OPN decreased the sperm binding to the BOECs and the concentration of 0.5 µg /1 x 10⁶ spermatozoa increased the rate of cleavage and formation of blastocysts. This corroborates the capacitive power of the OPN of 60KDa on the spermatozoa, and confirm that it can have direct associations with both gametes, generating better rates of *in vitro* fertilization and, therefore, better embryonic development in cattle. However, from the results obtained in the first two tests, we believe that the OPN needs an incubation time of more than one hour to achieve saturation of the glycoprotein in spermatozoa and thus observe an effect.

Key words: viability, explant, fertilization, capacitation

366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380

References

- [1] Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caravielho DZ, Geiger LN, Schenk JL, et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod Sci* 2004;1:86–90.
- [2] Bodmer M, Janett F, Hassig M, Daas N den, Reichert P, Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 2005;64:1647–55.
- [3] Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. Pregnancy Rates in Lactating Holstein – Friesian Cows after Artificial Insemination with Sexed Sperm 2006;97:95–7.

- 390 [4] Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourão GB, Dode MAN. Quality
391 assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and
392 their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 2010;74:1521–30.
- 393 [5] Dejarnette JM, Leach MA, Nebel RL, Marshall CE, McCleary CR, Moreno JF.
394 Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers :
395 Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible ? *J Dairy*
396 *Sci* 2011;94:3477–83.
- 397 [6] Sales JNS, Neves KAL, Souza AH, Crepaldi GA, Sala R V, Fosado M. Timing
398 of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial
399 insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2011;76:427–35.
- 400 [7] Healy AA, House JK, Thomson PC. Artificial insemination field data on the use
401 of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *J Dairy Sci*
402 2013;96:1905–14.
- 403 [8] Liu X, Hu T, Sun W, Hao H, Liu Y, Zhao X, et al. Comparison of the
404 developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro
405 fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. *Livest Sci*
406 2015;181:263–70.
- 407 [9] Garner DL, Seidel GE. History of commercializing sexed semen for cattle.
408 *Theriogenology* 2008;69:886–95.
- 409 [10] Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe DJ.
410 Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle.
411 *Theriogenology* 2006;65:219–27.
- 412

- 413 [11] Mocé E, Graham JK, Schenk JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and
414 cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*
415 2006;66:929–36.
- 416 [12] Carvalho JO, Silva LP, Sartori R, Dode MAN. Nanoscale Differences in the
417 Shape and Size of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Sperm Heads Assessed
418 by Atomic Force Microscopy. *PLoS One* 2013;8.
- 419 [13] Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML,
420 Matthews DL, et al. In Vitro Production of Holstein Embryos Using Sex-Sorted
421 Sperm and Oocytes from Selected Cull Cows. *J Dairy Sci* 2005;88:776–82.
- 422 [14] Morton KM, Catt SL, Hollinshead FK, Maxwell WMC, Evans G. The effect of
423 gamete co-incubation time during in vitro fertilization with frozen-thawed
424 unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of in vitro matured
425 adult and prepubertal ewe oocytes. *Theriogenology* 2005;64:363–77.
- 426 [15] Palma g a, Olivier n s, Neumüller C, Sinowatz F. Effects of Sex-sorted
427 Spermatozoa on the Efficiency of in vitro Fertilization and Ultrastructure of in
428 vitro Produced Bovine Blastocysts. *Anat Histol Embryol* 2008;37:67–73.
- 429 [16] Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WMC, Evans G. Pregnancy
430 loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-
431 frozen-thawed dairy bull sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;118:7–12.
- 432 [17] Mikkola M, Taponen J. Quality and developmental rate of embryos produced
433 with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle.
434 *Theriogenology* 2017;87:135–40.

435

- 436 [18] Holt W V., Fazeli A. Sperm selection in the female mammalian reproductive
437 tract. Focus on the oviduct: Hypotheses, mechanisms, and new opportunities.
438 *Theriogenology* 2015;85:105–12.
- 439 [19] Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. Roles of the oviduct in
440 mammalian fertilization. *Reproduction* 2012;144:649–60.
- 441 [20] Killian G. Physiology and endocrinology symposium: Evidence that oviduct
442 secretions influence sperm function: A retrospective view for livestock. *J Anim*
443 *Sci* 2011;89:1315–22.
- 444 [21] McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamaño J., Didion BA, et al.
445 Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves
446 Efficiency of Porcine Fertilization In Vitro1. *Biol Reprod* 2003;69:828–34.
- 447 [22] Quintero I, Ghersevich S, Caille A, Munuce MJ, Daniele SM, Morisoli L. Effects
448 of human oviductal in vitro secretion on spermatozoa and search of sperm-
449 oviductal proteins interactions. *Int J Androl* 2005;28:137–43.
- 450 [23] Zhang M, Hong H, Zhou B, Jin S, Wang C, Fu M, et al. The expression of atrial
451 natriuretic peptide in the oviduct and its functions in pig spermatozoa. *J*
452 *Endocrinol* 2006;189:493–507.
- 453 [24] Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A,
454 Vázquez JM, et al. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*
455 2005;63:514–35.
- 456
- 457
- 458

- 459 [25] Luño V, Úbeda rebeca lópez, García-vásquez francisco alberto, Gil L, Matás C.
460 Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal
461 epithelial cells: in vitro , ex vivo , and in vivo models. *Reproduction*
462 2006;146:315–24.
- 463 [26] Miller DJ. Regulation of Sperm Function by Oviduct Fluid and the Epithelium:
464 Insight into the Role of Glycans. *Reprod Domest Anim* 2015;50:31–9.
- 465 [27] Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function,
466 fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:141–53.
- 467 [28] Navarrete Gómez P, Espinoza Ruiz J, Parodi Rivera J, Alvarez JG, Sánchez
468 Gutiérrez R. Protective effect of fallopian tubal fluid against activated leucocyte-
469 induced sperm DNA fragmentation: Preliminary results. *Andrologia*
470 2009;41:196–8.
- 471 [29] Rodriguez-martinez H. Role of the oviduct in sperm capacitation.
472 *Theriogenology* 2007;68:S138–46. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.03.018.
- 473 [30] Moura a. a. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case
474 for osteopontin. *Anim Reprod* 2005;2:3–10.
- 475 [31] Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ. Detection of osteopontin on
476 Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and
477 its potential role in bovine fertilization. *Reproduction* 2007;133:909–17..
- 478 [32] Pero ME, Killian GJ, Lombardi P, Zicarelli L, Avallone L, Gasparrini B.
479 Identification of Osteopontin in water buffalo semen. *Reprod Fertil Dev*
480 2007;19:279.
- 481

- 482 [33] Gonçalves r f, Chapman d a, Bertolla r p, Eder I, Killian g j. Pre-treatment of
483 cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro
484 fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2008;108:375–83.
- 485 [34] Hao Y, Murphy CN, Spate L, Wax D, Zhong Z, Samuel M, et al. Osteopontin
486 improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. *Mol*
487 *Reprod Dev* 2008;75:291–8.
- 488 [35] Monaco E, Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Attanasio L, Zicarelli L, et al.
489 Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle.
490 *Theriogenology* 2009;71:450–7.
- 491 [36] Boccia L, Di Francesco S, Neglia G, De Blasi M, Longobardi V, Campanile G, et
492 al. Osteopontin improves sperm capacitation and in vitro fertilization efficiency
493 in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 2013;80:212–7..
- 494 [37] Kumar P, Saini M, Kumar D, Bharadwaj A, Yadav PS. Estimation of endogenous
495 levels of osteopontin, total antioxidant capacity and malondialdehyde in seminal
496 plasma: Application for fertility assessment in buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls.
497 *Reprod Domest Anim* 2016;52:221–6.
- 498 [38] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm
499 by heparin. *Biol Reprod* 1988;38:1171–80.
- 500 [39] Kovács A, Foote RH. Viability and Acrosome Staining of bull, boar and rabbit
501 spermatozoa. *Biotech Histochem* 1992;67:119–1224.
- 502 [40] Killian GJ, Chapman D a, Rogowski L a. Fertility-associated proteins in Holstein
503 bull seminal plasma. *Biol Reprod* 1993;49:1202–7.
- 504

- 505 [41] Cancel a M, Chapman D a, Killian GJ. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-
506 associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 1997;57:1293–
507 301.
- 508 [42] Braundmeier AG, Miller DJ. Invited Review : The Search is on : Finding
509 Accurate Molecular Markers of Male Fertility. *J Dairy Sci* 2001;84:1915–25.
- 510 [43] Waheed MM, El-Bahr SM, Al-haider AK. Influence of Seminal Plasma
511 Antioxidants and Osteopontin on Fertility of the Arabian Horse. *J Equine Vet Sci*
512 2013;33:705–9.
- 513 [44] Dejarnette JM, Mccleary CR, Leach MA, Moreno JF, Nebel RL, Marshall CE. of
514 Holstein cows and heifers. *J Dairy Sci* 2010;93:4079–85.
- 515 [45] Missio D, Folchini NP, Leivas FG, Isabel C, Urquiza I, Pavin M, et al. Reduction
516 in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without a
517 ff ecting sperm quality and early embryonic development. *Anim Reprod Sci*
518 2018;192:146–53.
- 519 [46] Carvalho J de O, Sartori R, Rodello L, Mourão GB, Bicudo SD, Margot MA.
520 Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their
521 capacity to bind to oviductal cells. *Livest Sci* 2018;207:30–7.
- 522 [47] Bucci D, Galeati G, Tamanini C, Vallorani C, Rodriguez-gil JE, Spinaci M.
523 Effect of sex sorting on CTC staining , actin cytoskeleton and tyrosine
524 phosphorylation in bull and boar spermatozoa. *Theriogenology* 2012;77:1206–
525 16.
- 526
- 527

- 528 [48] Handrow RR, First NL, Parrish JJ. Calcium Requirement and Increased
529 Association With Bovine Sperm During Capacitation by Heparin. *J Exp Zool*
530 1989;182:174–82.
- 531 [49] Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM. Enzymatic dissection of the
532 functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol* 1984;106:243–55.
- 533 [50] Fazeli a, Duncan a E, Watson PF, Holt W V. Sperm-oviduct interaction:
534 Induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa
535 to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 1999;60:879–86.
- 536 [51] Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-martinez H. Sperm capacitation in the
537 porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* 2004;80:131–46.
- 538 [52] Pollard john w, Plante C, King w allan, Hansen peter j, Betteridge keith j,
539 Suarez susan s. Fertilizing Capacity of Bovine Sperm May to Oviductal
540 Epithelial Be Maintained by Binding. *Biol Reprod* 1991;44:102–7.
- 541 [53] Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS. PDC-109 (BSP-A1 / A2) Promotes Bull
542 Sperm Binding to Oviductal Epithelium In Vitro and May Be Involved in
543 Forming the Oviductal Sperm Reservoir 1. *Biol Reprod* 2003;69:809–15.
- 544 [54] Foye-jackson o t, Long j a, Bakst m r, Blomberg l a, Akuffo v g, Silva m v b,
545 et al. Oviductal expression of avidin , avidin-related protein-2 , and progesterone
546 receptor in turkey hens in relation to sperm storage : Effects of oviduct tissue
547 type , sperm presence , and turkey line. *Poult Sci* 2011;9:1539–47.
- 548
- 549
- 550

- 551 [55] Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Kelsey N, et al. Porcine
552 Sperm Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to Form the Oviduct
553 Reservoir Porcine Sperm Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to
554 Form the Oviduct. *Biol Reprod* 2012;87:147–1.
- 555 [56] Pauw IMC De, Soom A Van, Laevens H, Verberckmoes S, Kruif A De. Sperm
556 Binding to Epithelial Oviduct Explants in Bulls with Different Nonreturn Rates
557 Investigated with a New In Vitro Model 1. *Biol Reprod* 2002;67:1073–9.
- 558 [57] Gualtieri R, Mollo V, Braun S, Barbato V, Fiorentino I, Talevi R. Long-term
559 viability and differentiation of bovine oviductal monolayers : Bidimensional
560 versus three-dimensional culture. *Theriogenology* 2012;78:1456–64.
- 561 [58] Publicover S, Harper C V, Barratt C. [Ca²⁺]_i signalling in sperm — making
562 the most of what you ’ ve got. *Nat Cell Biol* 2007;9:235–42.
- 563 [59] Lishko P V, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺
564 channel of human sperm. *Nature* 2011;471:387–91.
- 565 [60] Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar nachiket d, Weyand I, Seifert R, et
566 al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human
567 sperm. *Nature* 2011;471:382.
- 568 [61] Bailey DW, Dunlap KA, Erikson DW, Patel AK, Bazer FW, Burghardt RC, et al.
569 Effects of long-term progesterone exposure on porcine uterine gene expression:
570 progesterone alone does not induce secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) in
571 glandular epithelium. *Reproduction* 2010;140:595–604.
- 572
- 573

- 574 [62] Bureau VE, Bailey JL. Binding Regulation of Porcine Spermatozoa to Oviductal
575 Vesicles In Vitro. *J Androl* 2002;23:188–93.
- 576 [63] Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Töpfer-Petersen E.
577 Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction*
578 2001;121:889–96.
- 579 [64] Almiñana C, Caballero I, Heath PR, Maleki-dizaji S, Parrilla I, Cuello C, et al.
580 The battle of the sexes starts in the oviduct : modulation of oviductal
581 transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. *BMC Genomics* 2014;15:293.
- 582 [65] Dyk Q Van, Mahony MC, Hodgen GD. Differential binding of X- and Y-
583 chromosome-bearing human spermatozoa to zona pellucida in vitro. *Andrologia*
584 2001;33:199–205.
- 585 [66] Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi D, Parati K, Bongioni G, et al. In vitro
586 fertilisation with frozen–thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and
587 validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction* 2006;132:519–26.
- 588 [67] Trigal B, Gómez E, Caamaño JN, Muñoz M, Moreno J, Carrocera S, et al. In
589 vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted
590 sperm. *Theriogenology* 2012;78:1465–75.
- 591 [68] Morotti F, Sanches B V, Pontes JHF, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, et al.
592 *Theriogenology* Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF
593 program using reverse-sorted semen in *Bos indicus* , *Bos indicus-taurus* , and *Bos*
594 *taurus* cattle. *Theriogenology* 2014;81:696–701.