



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 spermatic 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

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Desde o início da comercialização de sêmen sexado por citometria de fluxo (2004-2006), tem se observado um incremento notável em seu uso, quando comparado com o sêmen não sexados (MISIO et al., 2018). Aproveitar as vantagens do sêmen sexado para melhorar a eficiência da produção e proporcionar produtos de origem animal que sejam econômicos e ambientalmente sustentáveis, poderia ser uma das alternativas para diminuir os problemas ambientais reduzindo a população de animais do sexo indesejado, quando sêmen não sexados é usado. Segundo dados da FAO, (sigla do inglês Food and Agriculture Organization- 2014) e o IBGE (2016), há uma diminuição das terras para uso agropecuário e dos recursos no período de 1961 a 2016, ao mesmo tempo, o número total do rebanho bovino e bubalino incremento cerca de 125 milhões de cabeças em 1985 a 218,23 milhões em 2016, aumentando a produção de gases efeito estufa e incrementando os problemas ambientais (MCMICHAEL et al., 2007; LASSEY, 2007).

Por outro lado, pesquisas apontam que em gado de leite a sexagem para produção de fêmeas no primeiro parto aumenta a produção láctea (HINDE et al., 2014), e diminuem os partos distócicos em 20% (SEIDEL, 2003). As vantagens do sêmen sexado são inumeráveis, no entanto, diversos estudos têm demonstrado que a fertilidade *in vivo* e *in vitro* é inferior quando comparado ao sêmen não sexados (SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013).

Para que aconteça a fertilização, o espermatozoide após a monta natural ou inseminação artificial (IA) devem percorrer o trato reprodutivo feminino e alcançar a tuba uterina para se ligar as células epiteliais do istmo formando o reservatório espermático. Esta ligação seleciona os melhores espermatozoides, devido a algumas características próprias (TEIJEIRO; MARINI, 2012), e os protege, mantendo sua viabilidade até o momento exato da liberação do oócito, quando também são liberados garantindo a fecundação.

Acredita-se que durante o processo de sexagem e criopreservação, a capacidade de ligação ao reservatório e a viabilidade espermática são afetadas, aumentando as taxas de retorno do cio nos animais inseminados *in vivo* e diminuindo a taxa de produção de embriões *in vitro* (DE PAUW et al., 2002; CARVALHO et al.,

2013). Na busca de moléculas que ajudem a aumentar as taxas de fertilização, alguns estudos têm relatado a descoberta de várias glicoproteínas presentes no plasma seminal e no fluido da tuba uterina com propriedades de união célula-célula, participação nos processos de capacitação espermática, fertilização, taxa de clivagem, desenvolvimento embrionário entre outras (GONÇALVES et al., 2008; KILLIAN et al., 2011; BOCCIA et al., 2013).

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína não apenas encontrada nas células epiteliais e nas secreções do trato gastrointestinal, rim, tireoides e mama, mas também nos tecidos reprodutivos, como: tuba uterina, útero, placenta e testículos (GABLER et al., 2003), tem evidenciado diversas funções no sistema reprodutivo como, aumentar a taxa de fertilidade, clivagem, desenvolvimento embrionário em diferentes espécies quando usada na produção *in vitro* de embriões entre outras (HAO et al., 2006, 2008; GONÇALVES et al., 2008; MONACO et al., 2009; BOCCIA et al., 2013; LIU et al., 2015). Sua presença em altas concentrações no plasma seminal tem relação com uma alta fertilidade nos machos (KILLIAN 1993; CANCEL et al., 1997; MOURA 2006; PERO et al., 2007; WAHEED et al., 2015; KUMAR et al., 2016). Embora a regulação desta glicoproteína na reprodução de mamíferos tenha sido bem documentada, seu papel no desenvolvimento dos processos reprodutivos permanece mal compreendido, especialmente em animais domésticos.

Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo determinar a participação da OPN na fertilização quando adicionada ao sêmen sexado bovino, em concentrações diferentes, avaliando o efeito sob a viabilidade espermática, a capacidade para unir-se às células da tuba uterina utilizando um modelo *in vitro* e avaliando a produção de embriões bovinos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. Célula sexual masculina, o espermatozoide

Os espermatozoides são células altamente especializadas produzidas nos testículos por um processo conhecido como espermatogênese e maturados nos epidídimos (SETCHELL, 1993). Estas células, classificadas como terminais (PURDY, 2006), têm uma estrutura voltada para sua única atividade funcional, garantir a liberação do material genético que se encontra condensado no seu núcleo (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006) para o interior do oócito, onde posteriormente, pela fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, forma-se o zigoto (AURICH, 2005).

Os espermatozoides apresentam três regiões: cabeça, colo e cauda (SINGH, 2006). A cabeça é composta principalmente pelo núcleo, acrossoma e região pós-acrossomal (PESCH; BERGMANN, 2006). No núcleo está contido o DNA, acondicionado por um envelope nuclear; sua integridade é indispensável para que exista o perfeito desenvolvimento embrionário e a gestação seja levada a termo (ROUX et al., 2004). No acrossoma encontram-se enzimas hidrolíticas que são liberadas durante a reação acrossômica, para permitir a penetração do espermatozoide na zona pelúcida (ZP) do oócito (PESCH; BERGMANN, 2006) ocorrendo a fertilização. A região pós-acrossomal exerce um importante papel na ligação com o oócito (JUHÁSZ et al., 2000).

Outros componentes do espermatozoide são o colo e a cauda. O colo representa a pequena área de ligação entre a cabeça e a peça intermediária (MIES FILHO et al., 2004); e a cauda, responsável pela cinética da célula, que corresponde a parte mais longa do espermatozoide e encontra-se dividida em peça intermediária, principal e terminal (SINGH, 2006).

Adicionalmente, a célula espermática está completamente revestida pela membrana plasmática, entre as funções encontramos: manter por meio da sua permeabilidade, o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. Esta membrana celular flexível exerce a função de barreira física, protegendo os espermatozoides durante seu deslocamento pelos tratos genitais masculino e feminino (AMANN; GRAHAM, 2010).

A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica com proteínas integrais, periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídeos

organizados em um mosaico fluído (FLESCHE; GADELLA, 2000). Três tipos de moléculas a compõe: os lipídios, responsáveis pela integridade estrutural; as proteínas, responsáveis pelos processos dinâmicos e os carboidratos, que aumentam o caráter hidrofílico e estabilizam a estrutura da membrana (ALMEIDA, 2006).

No que se refere a manutenção da integridade estrutural da membrana espermática, a principal molécula é o colesterol. Este estabiliza a membrana, preenchendo os espaços entre as cadeias de ácidos graxos e de fosfolipídios (CROSS, 1998). A sua remoção pode acarretar na total desestabilização e, conseqüentemente, reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais e aumento da sua capacidade de fusão (GONZALEZ, 2004). Estudos demonstram a existência de uma relação direta entre o teor do colesterol e lipídeos de cadeia insaturada na membrana plasmática e uma resistência ao choque frio, ou seja, quanto menor resistência ao choque frio menor teor de colesterol nas células (WALES; WHITE 1959; POULOS et al., 1973).

Deste modo, para que os espermatozoides tenham sucesso na fertilização, é necessário que apresentem membranas e organelas funcionais e genoma haploide intacto, visto que, apenas nestas condições os gametas masculinos podem sofrer hiperativação, capacitação e reação acrossomal (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

2.2. Espermatozoides sexados

Nos mamíferos, a principal regulação da determinação do sexo depende da informação cromossômica nos gametas. O oócito sempre possui cromossomo X e o espermatozoide tem cromossomo X ou Y (GARNER; SEIDEL, 2008). Visto isto, várias são as pesquisas envolvendo a sexagem espermática para desenvolver uma técnica que tenha aplicabilidade comercial, apresente uma metodologia estabelecida, minimize a perda de espermatozoides durante a sexagem sem diminuir o poder fecundante dos mesmos e que seja compatível com o processo de criopreservação (LIMA, 2006).

Diversas são as técnicas que têm sido testadas para sexagem de espermatozoides, no entanto, até o momento o único procedimento que tem se mostrado comercialmente eficaz na separação de células com cromossomos femininos (X) e masculinos (Y), é a citometria de fluxo. Método baseado na diferença do conteúdo de DNA dos espermatozoides, onde nos bovinos, o cromossomo X

contém em torno de 4% a mais de DNA, do que o cromossomo Y (GARNER et al. 1983; JOHSON; FLOOK; HAMK, 1989). O surgimento desta técnica trouxe aos produtores rurais grandes expectativas de maior ganho econômico. Porém, o alto custo das doses sexadas e a baixa taxa de prenhez, quando comparada com a do sêmen não sexado, tornou-a pouco eficaz (GARNER; SEIDEL, 2008).

Diversas pesquisas demonstraram que o uso de semen sexado em programas de IA ou transferência de embriões tem desvantagens, devido a baixa taxa de fertilização quando comparado com o sêmen não sexado (SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013). No entanto, os trabalhos de Carvalho et al. (2012) e Bondan, (2015) identificaram que ainda com as alterações do processo de sexagem e a baixa concentração das palhetas, não há comprometimento da capacidade de fecundação das células espermáticas nem da produção de embriões *in vitro*.

Acredita-se que, *in vivo*, uma das consequências da sexagem é a diminuição do tempo de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino (TRF) e da capacidade de ligação destes às células da tuba uterina (CTU) para formação do reservatório espermático. Há também evidências de que o processo de sexagem pode induzir lesão da membrana plasmática e reação acrossômica, assim, o espermatozoide sofre uma cascata de eventos que culminam na sua morte (MOCE et al., 2006; BLONDIM et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Portanto, é possível que os espermatozoides sexados se mantenham viáveis por menor tempo, comprometendo a taxa de fecundação *in vivo*.

Além disto, foi identificado que o processo de sexagem também altera a morfologia da cabeça dos espermatozoides, assim como algumas características de sua superfície. Deste modo à associação da alteração na forma da cabeça dos espermatozoides, juntamente com a capacitação prematura causada pelo processo de sexagem provoca a perda de algumas proteínas de membrana que seriam importantes na formação e manutenção do reservatório espermático (CARVALHO et al., 2012 e 2013) e posterior fertilização.

2.3. Capacitação espermática

Os espermatozoides dos mamíferos mesmo apresentando uma adequada motilidade e aparente normalidade morfológica, não são capazes de fecundar os oócitos logo após a ejaculação, adquirindo esta capacidade somente no TRF em um processo tempo-dependente denominado capacitação espermática (PEREIRA et al., 2000). Este processo induz uma série de modificações na estrutura e motilidade do espermatozoide que resultaram no aumento da sua afinidade pela zona pelúcida, propiciando a fertilização (FLESCH; GADELLA, 2000; PARRISH, 2014). *In vitro*, vários estudos foram realizados para conseguir mimetizar este processo e aumentar as taxas de fertilidade (BOCCIA et al., 2013; LIU et al., 2015a; MIKKOLA; TAPONEN, 2017).

Durante a capacitação o espermatozoide sofre alterações substanciais, como, perda ou modificação de antígenos de superfície (BERGER 1990; MYLES et al., 1990), alterações na distribuição de partículas intramembranas (BEARER; FRIEND 1982; TESARIK, 1984), alterações na carga de superfície (BEDFORD 1963; HARTREE; SRIVASTAVA 1965; ROSADA 1974), alterações nos carboidratos e glicoproteínas de superfície (GORDON 1975; YANAGIMACHI et al., 1981), de esteróis de membrana (EHRENWALD et al., 1990; RAVNIK et al., 1990), nos íons intracelulares, sistema adenilato ciclase cAMP e membrana plasmática (YANAGIMACHI, 1994).

Um dos principais eventos que acontecem na capacitação é o efluxo de colesterol e o ingresso de cálcio (Ca^{2+}) e bicarbonato (HCO_3^-) ao citosol (OLIVERA et al., 2006) a partir da membrana espermática. Este efluxo leva a mudanças na relação colesterol/fosfolipídios, que resulta na redistribuição de proteínas na membrana plasmática, permitindo a abertura de canais de Ca^{2+} e com isso um aumento nos níveis deste íon intracelular (DELPECH; THIBAUT, 1993). A albumina presente tanto nos meios de capacitação *in vitro* quanto no fluido da tuba uterina *in vivo* atua retirando o colesterol da membrana (LANGLAIS, 1985; DAVIS, 1979; CROSS, 1998). Há evidências de que o HCO_3^- também pode facilitar a desorganização da membrana, principalmente na região apical da cabeça do espermatozoide (GADELLA et al., 2001).

Colebrander et al. (2002), descreveram que *in vivo* a capacitação não depende somente de Ca^{2+} , mas também de HCO_3^- , uma vez que este, está presente em níveis mais elevados na tuba uterina (20 mM) do que no fluído espermático (<1

mM). Esta molécula estimula a forma solúvel da adenilciclase (AC), abundante nos espermatozoides, resultando assim no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que ativa a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de resíduos de tirosina (GADELLA et al., 2001). Esta fosforilação atua como mediadora de uma variedade de funções celulares, como a regulação do controle de ciclos celulares, regulação de íons, a formação do citoesqueleto, além de ser um componente essencial da capacitação espermática por ativar proteínas da membrana plasmática relacionadas com a ligação na zona pelúcida (VISCONTI; KOPF, 1998).

Todas estas modificações permitem que o espermatozoide experimente mudanças no seu padrão de movimento, passando de movimentos retilíneos para fortes impulsos oscilantes da cabeça conhecidos como hiperativação espermática. Além de adquirir a capacidade para realizar a reação acrossômica, permitindo a liberação de enzimas acrossomais na zona pelúcida para a penetração do oócito (JOHNSON, 2007).

2.4. Tuba uterina e o reservatório espermático

A tuba uterina também denominada oviduto, é uma estrutura tubular, de natureza predominantemente muscular que liga os ovários aos cornos uterinos (HAFEZ, 2004). Possui papel essencial na reprodução dos mamíferos, promovendo um microambiente favorável para maturação oocitária, estocagem, capacitação espermática, transporte dos gametas, fertilização e desenvolvimento inicial do embrião (BUHI, 2002; HUNTER, 2005).

Anatômica e funcionalmente, a tuba uterina é dividida em três regiões: 1) infundíbulo, região mais próxima ao ovário; composto por fimbrias que ajudam na captação de oócito. 2) Ampola, região média; proporciona um ambiente adequado a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial e 3) istmo, região mais próxima ao útero; cuja função é o armazenamento espermático (YÁNIZ et al., 2000). Além destas regiões existem as zonas de transição, sendo as mais conhecidas a junção útero tubárica (JUT); união entre o útero e o istmo e a junção istmo-ampolar (JIA), local onde acontece a fecundação (YÁNIZ et al., 2000; HOLT; FAZELI 2015).

Histologicamente a tuba uterina é formada por musculatura lisa circular e longitudinal (KENNGOTT; SINOWATZ, 2007). Recoberta por epitélio cilíndrico simples com células ciliadas e células secretoras, não-ciliadas (MOUGUELAR et al., 2015), que variam de acordo com a idade do animal, estágio do ciclo estral e espécie (ŠŤASTNÝ et al., 2013). Morfologicamente possui dobras longitudinais em toda sua extensão, que variam em tamanho e número (LOMBARD et al., 1950).

Durante a fase folicular observa-se no infundíbulo, células ciliadas proeminentes e numerosas em áreas apicais e células não ciliadas em áreas basais. Na fase luteal se observa diminuição de células ciliadas e aumento de não ciliadas. Na ampola nota-se um epitélio semelhante ao infundíbulo, no entanto, as diferenças entre as fases do ciclo estral e entre as áreas basais e apicais diminuem em direção à ampola caudal, onde menos células secretoras são evidentes. No istmo se evidencia pouca alteração na quantidade de células ciliadas entre as fases do ciclo estral nas áreas apicais, no entanto, no diestro e metaestro entre as dobras há menor quantidade de células ciliadas e no estro e no diestro maior quantidade de células não ciliadas (YÁNIZ et al., 2000).

Como já descrito, um dos principais papéis da tuba é a formação do reservatório espermático entre a JUT e o istmo. Sua principal função é manter os espermatozoides protegidos, caracterizado pela supressão da motilidade e da capacitação (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005), prolongando a viabilidade e a função espermática (ORR; ZUK 2014) mediante a supressão de níveis altos de Ca^{2+} intracelular (DOBRINSKI et al., 1996, 1997). Segundo Mburu et al. (1996), Sumransap et al. (2007) e Karre et al. (2012), só 10 % dos espermatozoides que entram no trato reprodutivo feminino tem a capacidade de entrar na tuba e se ligar ao epitélio para formar o reservatório. Esta ligação reconhece e seleciona uma população de espermatozoides férteis (TEIJEIRO; MARINI, 2012) com acrossoma intacto (GUALTIERI; TALEVI, 2000), não capacitados (FAZELI et al., 1999), morfolologicamente normais (GREEN et al., 2001; YESTE et al., 2012) e sem fragmentação da cromatina (ARDÓN et al., 2008).

A ligação espermatozoide-tuba envolve interações moleculares espécie-específicas (TALEVI; GUALTIERI, 2010), mediadas principalmente por oligossacarídeos (KADIRVEL et al., 2012) e por proteínas específicas de ligação ao espermatozoide expressas pelas células da tuba. Em bovinos, foi observado que as proteínas BSP (do inglês, **B**inder of **S**Perm) presentes na membrana do

espermatozoide reconhecem o componente fucose contido nos receptores do epitélio (LEFEBVRE et al., 1997; IGNOTZ et al., 2001). A presença de fucose foi identificada em receptores conhecidos como anexinas. Quatro anexinas são conhecidas; ANXA1, ANXA2, ANXA3 E ANXA5, todas presentes na superfície apical da mucosa do epitélio da tuba, especificamente nos cílios (IGNOTZ et al., 2007). Outra molécula que interage na formação do reservatório é a osteopontina (OPN), glicoproteína envolvida com a adesão celular, fertilização e desenvolvimento.

2.5. Transporte de gametas

A fecundação é o processo de reconhecimento espécie específico, onde os gametas são transportados até o local da fecundação e se dá a fusão do material genético (TALBOT et al., 2003), do mesmo modo que a precisão temporal no transporte do embrião até o útero, para ser implantado (PULKKINEN, 1995). Este processo tem origem após a cobertura e/ou IA, onde o sêmen é depositado no TRF entrando em contato com a mucosa uterina.

Uma vez que os espermatozoides têm contato com a mucosa uterina, são detectados como estranhos ao organismo, e como resposta a esta invasão, é desencadeada uma reação inflamatória fisiológica (ROBERTSON, 2005), transitória e essencial para a remoção dos espermatozoides mortos e outras substâncias prejudiciais para o desenvolvimento normal da futura gestação. Esta reação é caracterizada pela infiltração rápida de leucócitos, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (WERNER, 2010).

Para sobreviver à resposta inflamatória uterina, os espermatozoides necessitam atingir a tuba uterina dentro de poucas horas após sua chegada no lúmen uterino, evitando assim a fagocitose pelos PMN que estarão presentes no lúmen uterino bovino quatro horas após cobertura ou IA (KAUFMANN et al., 2009). Estudos realizados por Scaldelai et al. (2010) mostraram que a habilidade das células espermáticas criopreservadas em ascenderem à tuba uterina e alcançarem a JUT diminui quando comparada com espermatozoides não criopreservados. De igual maneira, Watson, (2000) evidenciou uma maior resposta inflamatória quando se depositou sêmen congelado dentro do lúmen uterino, devido à grande porcentagem de espermatozoides que morrem devido ao processo de criopreservação.

A subpopulação de espermatozoides que superou o processo inflamatório e atingiu a tuba uterina (JUT e o istmo), se liga às células ciliares da tuba (KÖLLE et al., 2009). Esta ligação forma o reservatório espermático que como já supracitado, mantém os espermatozoides em um estado protetor, (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005), prolongando a viabilidade e a função espermática (ORR; ZUK, 2014) até o oócito estar pronto para ser fertilizado.

Por outro lado, e paralelamente com os eventos que acontecem no espermatozoide, sinais hormonais induzem a ovulação do folículo pré-ovulatório, liberando um complexo cumulus-oócito (COC) constituído por um oócito envolto por numerosas camadas de células do *cumulus* (FAMILIARI et al., 1998). Durante o percurso pela tuba uterina o COC que teve expansão do *cumulus* no folículo pelo estímulo do LH, modifica a zona pelúcida (ZP) e aumenta a acessibilidade ao fluido da tuba (FUNAHASHI et al., 2001; EINSPANIER et al., 1999). Ao chegar na ampola, o COC já maduro, adere-se fortemente ao epitélio da tuba para esperar a chegada dos espermatozoides (HO; SUAREZ, 2001). Segundo Kolle et al, (2009) a ligação do COC no epitélio da ampola é tão forte que apenas destruindo as células do *cumulus* é possível desgruda-lo do epitélio.

Os mesmos sinais hormonais que induzem a ovulação ativam a hiperativação e capacitação espermática, liberando os espermatozoides do reservatório (HO; SUAREZ, 2001), para iniciar a reação acrossômica e dar origem à fertilização (COY et al., 2008 e 2012).

2.6. Osteopontina (OPN)

A OPN é uma glicoproteína ácida também conhecida como fosfoproteína 1 segregada (SPP1), fosfoproteína óssea de 44 kDa, sialoproteína 1, 2ar, uropontina ou como ativador precoce de linfócitos T 1 (Eta1). Esta glicoproteína de matriz extracelular descrita inicialmente na matriz óssea de bovinos (FRANZEN; HEINEGARD, 1985), tem diversas funções no organismo associadas à adesão celular, remodelação do tecido, estimulação celular imune e quimiotaxia, sobrevivência celular, inibição da cristalização do oxalato de cálcio, sinalização intracelular, dinâmica do citoesqueleto e metástase tumoral (DENHARDT et al., 2001; LESSEY, 2002; MAZZALI et al., 2002; DENHARDT, 2004; WAI; KUO, 2004).

Sua participação nos diversos processos do organismo faz que a OPN, sofra extensa modificação pós-traducional, resultando em variantes de massa molecular entre 25-75 kDa (JOHNSON et al., 2003). Cancel et al. (1997) descobriram que a isoforma de 55 kDa provavelmente prevalecia em machos de fertilidade mais alta, enquanto Souza et al. (2008 e 2009) e Zhang et al. (2016) evidenciaram isoformas de OPN de 30kDa e 46,4- 37,7-36,5 KDa respectivamente. Todas elas, presentes em altas concentrações em animais (carneiro e cães) com alta fertilidade. De igual forma o aparelho reprodutivo de touros possui várias destas variantes (ERIKSON et al., 2007).

No organismo a OPN está presente em diversas partes, dentre elas encontramos o trato reprodutivo, onde sua presença foi determinada na tuba uterina, útero, placenta, testículo, espermatozoide, fluido de glândulas assessorias de humanos, suínos e bovinos (GABLER et al., 2003; BOCCIA et al., 2013; ERIKSON et al., 2007; GONCALVES et al., 2008; HAO et al., 2006; MONACO et al., 2009), no epidídimo de ratos (LUEDTKE 2002) e carneiros (ZHANG et al., 2016), e células de sertoli em suínos (KIM 2007). Estudos evidenciaram função e participação nos processos de capacitação espermática, união à zona pelúcida, fertilização, taxa de clivagem, desenvolvimento embrionário, bloqueio da polispermia, reconhecimento materno, e implantação embrionária (ERIKSON et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008; KILLIAN et al., 2011; BOCCIA et al., 2013).

Sua alta concentração no plasma seminal de touros, búfalos, garanhões e camelos foi determinada como significativamente maior nos grupos de alta fertilidade, quando comparado com os de baixa (KILLIAN 1993; CANCEL et al., 1997; MOURA 2006; PERO et al., 2007; WAHEED et al., 2013; WAHEED et al., 2015; KUMAR et al., 2016), chegando-se a observar em taurinos concentrações superiores a 4 vezes maiores que tem melhor fertilidade. Em búfalos uma diminuição de 50% das concentrações de OPN foi observada quando o sêmen foi criopreservado (PERO et al., 2007). Sua adição aos meios de fertilização *in vitro* (FIV) em suínos melhorou a fertilização em 41%, aumentou a taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário, diminuiu a polispermia e inibiu a apoptose e a fragmentação do DNA (HAO et al., 2006, 2008). Achados semelhantes foram observados em bovinos e bubalinos, (MONACO et al., 2009; BOCCIA et al., 2013), onde a incubação de oócitos com OPN sozinha ou em conjunto com a heparina, desencadeiou a capacitação espermática observando maior porcentagem de espermatozoides com reação acrossômica após incubação por

duas e quatro horas.

Em bovinos, foi observado que a adição de diferentes concentrações de OPN ao sêmen criopreservado e aos oócitos na maturação, aumenta a taxa de FIV, sugerindo que ambas células sexuais se associam com a OPN facilitando este processo e o desenvolvimento embrionário (GONÇALVES 2008a). De igual modo, os mesmos pesquisadores adicionaram anticorpos contra OPN e observaram a diminuição na porcentagem de blastocistos (GONÇALVES 2007). Resultados similares em camundongos foram encontrados por Liu et al (2015b).

Estudos realizados na tuba uterina bovina não acharam uma relação entre a expressão do RNAm de OPN e a fase do ciclo estral. Contudo, sua expressão teve uma tendência a ser mais alta durante a fase luteal inicial e baixa na fase da ovulação (GABLER et al., 2003). Em galinhas foi evidenciado que esta expressão é influenciada pelo estrogênio (LIM et al., 2012) e nas ratas sua expressão foi flutuante dependendo do ciclo estral (LIU et al., 2015b), encontrando níveis maiores no estro e menores em diestro, o que foi consistente com a mudança na concentração do estrogênio.

Embora não estejam esclarecidos os mecanismos exatos das funções da OPN, é sabido que a sinalização, adesão celular, migração e efeitos anti-apoptose estão correlacionados com vários de seus domínios, entre eles o domínio independente da sequência ácido arginina-glicina-aspartico (RGD) que medeia sua ligação com as integrinas $\alpha 5$ e αv (DENHARDT, 2001; WAI; KUO, 2004; KILLIAN, 2012; FRANK et al., 2017) e o domínio de ligação ao ácido hialurônico que se liga a glicoproteínas de membrana CD44 (KERR et al., 1991; WEBER 1996; CICHY; PURÉ, 2003). Já suas funções de capacitação espermática encontram-se relacionados com os domínios de ligação a heparina (DENHARDT et al., 2001), e não com os domínios de Ca^{2+} , uma vez que em bovinos, diferente de humanos, o fragmento de aminoácidos com domínio de ligação para este íon está ausente (KERR et al., 1991).

Os estudos supracitados indicam que o padrão de expressão OPN varia nas diferentes espécies e tecidos, sugerindo que suas funções são diversas (LUEDTKE et al., 2002; KIM; SHIN, 2007; CANCEL et al., 1997). Neste sentido a acreditamos que a adição de OPN diretamente ao sêmen sexado após descongelação pode melhorar os índices de fertilidade em bovinos, atenuando as alterações espermáticas produzidas no processo de sexagem.

HIPÓTESES

A hipótese do trabalho é que as funções da OPN podem ser antagônicas e são dose dependente. Mantendo a viabilidade espermática dos espermatozoides após IA, para a formação do reservatório espermático e melhorando a capacitação espermática quando utilizada para produção *in vitro* de embriões.

OBJETIVO GERAL

Determinar a quantidade de espermatozoides ligados às células da tuba uterina (explantes) e a porcentagem de embriões produzidos *in vitro* de espermatozoides bovino sexado e não sexado, tratados com diferentes concentrações de OPN.

Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade, integridade da membrana plasmática e a capacitação nos espermatozoides sexados e não sexados após adição de OPN.
- Definir a concentração de OPN que aumenta o número de espermatozoides unidos às células da tuba uterina e melhore a taxa de PIV.
- Estabelecer as diferenças entre espermatozoides sexados fêmea ou macho e não sexados, nos diferentes testes.

REFERÊNCIAS¹

- ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Oklahoma: John Wiley & Sons, 2010.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M. et al. Pregnancy rates in lactating Holstein-friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, p. 95-97, 2006.
- ARDON, F.; HELMS, D.; SAHIN, E. et al. Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. **Reproduction**, [S.l.] v. 135, n. 4, p. 461-470, 2008.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, [S.l.] v. 89, p. 65-75, 2005.
- BEARER, E. L.; FRIEND, D. S. et al. Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. **J Cell Biol**, [S.l.] v. 92, n. 3, p. 604-15, 1982.
- BEDFORD, J. M. Morphological Reaction of Spermatozoa in the Female Reproductive Tract of the Rabbit. **J Reprod Fertil**, [S.l.] v. 6, p. 245-55. 1963.
- BERGER, T. Changes in exposed membrane proteins during in vitro capacitation of boar sperm. **Mol Reprod Dev**, [S.l.] v. 27n. 3, p. 249-53, 1990.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V. et al. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, New York, v. 71, p. 30-38, 2009.
- BOCCIA, L.; FRANCESCO, S. D.; NEGLIA, G. et al. Osteopontin improves sperm capacitation and in vitro fertilization efficiency in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, [S.l.] v. 80, p. 212-217, 2013.
- BODMER, M.; JANETT, F.; HASSIG, M. et al. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, New York, v. 64, p. 1647-1655, 2005.

¹ Referências organizadas segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), NBR 6023, 2002.

BONDAN, J. A. **Sêmen sexado, finalmente é uma realidade?** Disponível em: <<http://www.semeia.com.br/site/artigo.hp?ID=60&IDC=1&PHPSESSID=8b33be216ebb66096488ec39a6ba5014>> Acesso em 27 mar. 2015.

BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct- specific, oestrogen dependente glycoprotein. **Reproduction**, [S.l.] v. 123, p. 355-362, 2002.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biol Reprod**, [S.l.] v. 57, p. 1293-1301, 1997.

CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; MACHADO, G. M. et al. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology**, New York, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

CARVALHO, J. O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; SARTORI, R. et al. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 79, p. 77-84, 2012.

CARVALHO, J. O.; SILVA, L. P.; SARTORI, R. et al. Nanoscale differences in the shape and size of x and y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscop. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. e59387, 2013.

CICHY, J.; PURÉ, E. The liberation of CD44. **J Cell Biol**, [S.l.] v. 161, p. 839-843, 2003.

COLENBRANDER, B.; BROUWERS, J. F. H. M.; NEILD, D. M. et al. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. **Theriogenology**, [S.l.] v. 58, n. 2-4, p. 341-345, 2002.

COY, P.; CÁNOVAS, S.; MONDÉJAR, I. et al. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.] v. 105, n. 41, p. 15809-15814, 2008.

COY, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, F. A.; VISCONTI, P. E. et al. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. **Reproduction**, [S.l.] v. 144, n. 6, p. 649-660, 2012.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol Reprod**, [S.l.] v. 59, n. 1, p. 7-11, 1998.

DAVIS, B. K.; BYRNE, R.; HUNGUND, B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. **Biochim Biophys Acta**, S.l. v. 558, n. 3, p. 257-66, 1979.

DEJARNETTE, J. M.; LEACH, M. A.; NEBEL, R. L. et al. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility

of sex-sorted and conventional semen plausible. **Jornal Dairy science, Champaing**, [S.I.] v. 94, p. 3477-3483, 2011.

DELPECH, S.; THIBAUT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses. 1993. p. 268-278.

DENHARDT, D. T.; GIACHELLI, C. M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, [S.I.] v. 41, n. 1, p. 723-749, 2001.

DENHARDT, D. T. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, May 10-12, 2002. **Calcif Tiss Int**, [S.I.] v. 74, p. 213-219, 2004.

DE PAUW, I.M.; VAN SOON, A.; LAEVENS, H.; VERBERCKMOES, S.; DE KRUIF, A. Sperm binding to epithelial oviduct explants in bulls with different nonreturn rates investigated with a new in vitro model. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 67, p. 1073-9, 2002.

DOBRINSKI, I.; SUÁREZ, S. S.; BALL, B. A. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 54, p. 783-8, 1996.

DOBRINSKI, I.; SMITH, T. T.; SUÁREZ, S. S. et al. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 56, p. 861-9, 1997.

EHRENWALD, E.; FOOTE, R. H.; PARKS, J. E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. **Mol Reprod Dev**, [S.I.] v. 25, n. 2, p. 195-204, 1990.

EINSPANIER, R.; GABLER, C.; BIESER, B. et al. Growth factors and extracellular matrix proteins in interactions of cumulus-oocyte complex, spermatozoa and oviduct. **J Reprod Fertil Suppl**, [S.I.] v. 54, p. 359-365, 1999.

ERIKSON, D. W.; WAY, A. L.; CHAPMAN, D. A. et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, [S.I.] v. 133, n. 5, p. 909-917, 2007.

FAMILIARI, G.; VERLENGIA, C.; NOTTOLA, S. A. et al. Ultrastructural features of bovine cumulus-corona cells surrounding oocytes, zygotes and early embryos. **Reprod Fertil Dev**, [S.I.] v. 10, p. 315-326, 1998.

FAZELI, A.; DUNCAN, A. E.; WATSON, P. F. et al. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. **Biology of reproduction**, [S.I.] v.

60, n.4, p. 879-886, 1999.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.] v. 1469, p. 197-235, 2000.

FRANK, J. W.; SEO, H.; BURGHARDT, R. C. et al. ITGAV (alpha v integrins) bind SPP1 (osteopontin) to support trophoblast cell adhesion. **Reproduction**, [S.l.] v. 153, n. 5, p. 695-706, 2017.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochemical Journal**, [S.l.] v. 232, p. 715-724, 1985.

FUNAHASHI, H.; EKWALL, H.; KIKUCHI, K. et al. Transmission electron microscopy studies of the zona reaction in pig oocytes fertilized in vivo and in vitro. **Reproduction**, [S.l.] v. 122, p. 443-452, 2001.

GABLER, C.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. **Reproduction**, [S.l.] v. 126, n. 6, p. 721-729, 2003.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Anim Reprod Sci**, [S.l.] v. 68, p. 249-265, 2001.

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D. et al. Quantification of the X- and Y- chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 28, p. 312-321, 1983.

GARNER, D. L.; SEIDEL, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, [S.l.] v. 69, p. 886–895, 2008.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozoide bovino**. 2004. 92 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alpha and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, [S.l.] v. 67, p. 468–74, 2007.

GONÇALVES, R. F.; CHAPMAN, D. A.; BERTOLLA, R. P. et al. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro fertilization and embryo development. **Anim Reprod Sci**, [S.l.] v. 108, p. 375-383, 2008a.

GORDON, M.; DANDEKAR, P. V.; BARTOSZEWICZ, W. The surface coat of epididymal, ejaculated and capacitated sperm. **J Ultrastruct Res**, [S.l.] v. 50, n. 2, p. 199-207, 1975.

GREEN, C. E.; BREDL, J.; HOLT, W. V. et al. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. **Reproduction**, [S.l.] v. 122, n. 2, p. 305-315, 2001.

GUALTIERI, R.; TALEVI, R. In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. **Biology of reproduction**, [S.l.] v. 62, n. 6, p. 1754-1762, 2000.

HAFEZ B.; HAFEZ E. S. E. **Reprodução Animal**. 7 edn., São Paulo: Manole. 2004.

HAO, Y.; MATHIALAGAN, N.; WALTERS, E. et al. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. **Biology of reproduction**, [S.l.] v. 75, n. 5, p. 726-733, 2006.

HAO, Y.; MURPHY, C. N.; SPATE, L. et al. Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. **Mol Reprod Dev**, [S.l.] v. 75, n. 2, p. 291-298, 2008.

HARTREE, E. F.; SRIVASTAVA, P. N. Chemical Composition of the Acrosomes of Ram Spermatozoa. **J Reprod Fertil**, [S.l.] v. 9, p. 47-60, 1965.

HEALY, A. A.; HOUSE, J. K.; THOMSON, P. C. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 1905-1914, 2013.

HINDE, K.; CARPENTER, A. J.; CLAY, J. S. et al. Holsteins favor heifers, not bulls: biased milk production programmed during pregnancy as a function of fetal sex. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e86169, 2014.

HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, [S.l.] v. 122, p. 519-526, 2001.

HOLT, W. V.; FAZELI, A. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms, and new opportunities. **Theriogenology**, [S.l.] v. 85, n. 1, p. 105-112, 2015.

HUNTER, R. H. F. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? **Reproduction Nutrition Development**, [S.l.] v. 45, n. 3, p. 281-290, 2005.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 1985-2016.

IGNOTZ, G. G.; LO, M. C.; PEREZ, C. L. et al. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for

formation of the oviductal sperm reservoir. **Biology of reproduction**, [S.I.] v. 64, n. 6, p. 1806-1811, 2001.

IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S.; Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 77, p. 906-913, 2007.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, L.; SODERQUIST, L. et al. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, [S.I.] v. 53, p. 859-875, 2000.

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; HAMK, H. W. Sex pre selection in rabbit: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, Madson, [S.I.] v. 41, p. 199-203, 1989.

JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER F. W. et al. Osteopontin: roles in implantation and placentation. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 69, p. 1458–1471, 2003.

JOHNSON, M. H. **Essential reproduction**. 6 ed. Oxford: John Wiley & sons, 2007.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M.; Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: A review. **Acta Vet. Brno**, [S.I.] v. 69, p. 247-259, 2000.

KAHLES, F.; FINDEISEN, H. M.; BRUEMMER, D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. **Molecular metabolism**, [S.I.] v. 3, n. 4, p. 384-393, 2014.

KADIRVEL, G.; MACHADO, S. A.; KORNELI, C. et al. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 87, p. 147, 2012.

KARRE, I.; MEYER-LINDENBERG, A.; URHAUSEN, C. et al. Distribution and viability of spermatozoa in the canine female genital tract during post-ovulatory oocyte maturation. **Acta Vet Scand**, [S.I.] v. 54, n. 1, p. 49, 2012.

KAUFMANN, T. B.; DRILLICH, M.; TENHAGEN, B. A.; et al. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4 h after insemination and its effects on first service conception rate. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 2, p. 385-391, 2009.

KENNGOTT, R. A.; SINOWATZ, F. Prenatal development of the bovine oviduct. **Anat Histol Embryol**, [S.I.] v. 36, n. 4, p. 272–283. 2007.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, [S.I.] v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

KILLIAN, G. Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. **Journal**

of **Animal Science**, [S.I.] v. 89, p. 1315–1322, 2011.

KILLIAN, G. Fertility-associated proteins in male and female reproductive fluids of cattle, **Anim. Reprod**, [S.I.] v. 9, p. 703-712, 2012.

KIM, S.; SHIN, T. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. **J Vet Sci**, [S.I.] v. 8, n. 2, p. 107-110, 2007.

KERR J. M.; FISHER L. W.; TERMINE J. D.; et al. The cDNA cloning and mRNA distribution of bovine osteopontin. **Gene**, [S.I.] v. 108, p. 237-243, 1991.

KÖLLE, S.; DUBIELZIG, S.; REESE, S. et al. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 81, p. 267-274, 2009.

KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D. et al. Estimation of endogenous levels of osteopontin, total antioxidant capacity and malondialdehyde in seminal plasma: Application for fertility assessment in buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. **Reprod Dom Anim**, [S.I.] v. 52, n. 2, p. 221-226, 2016.

LASSEY, K. R. Livestock methane emission: from the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. **Agricultural and forest meteorology**, v. 142, n. 2-4, p. 120-32, 2007.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, J. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Res**, [S.I.] v. 12, p. 183-224, 1985.

LEFEBVRE, R.; LO, M. C.; SUAREZ S. S. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. **Biol Reprod**, [S.I.] v. 56, p. 1198–1204, 1997.

LESSEY, B. A. Adhesion molecules and implantation. **J Reprod Immunol**, [S.I.] v. 55, p. 101-102, 2002.

LIMA, V. F. Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? **Acta Sci Vet**, [S.I.] v. 34, p. 213-24, 2006. Suplemento 1.

LIM, W.; JEONG, W.; KIM, J. et al. Differential expression of secreted phosphoprotein 1 in response to estradiol-17beta and in ovarian tumors in chickens. **Biochem Biophys Res Commun**, [S.I.] v. 422, p. 494–500, 2012.

LIU, X.; HU, T.; SUN, W. et al. Comparison of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. **Livestock Science**, [S.I.] v. 181, p. 263-270. 2015a.

LIU, Q.; XIE, Q. Z.; ZHOU, Y. et al. Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of

mouse. **Zygote**, [S.I.] v. 23, n. 4, p. 622-630, 2015 b.

LOMBARD, L.; BANNER, B. M.; MCNUTT, S. H. The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the oestrus cycle. **J Morphol**, [S.I.] v. 86, p. 1–15, 1950.

LUEDTKE, C. C.; MCKEE, M. D.; CYR, D. G., et al. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. **Biology of reproduction**, [S.I.] v. 66, n. 5, p. 1437-1448, 2002.

MAZZALI, M.; KIPARI, T.; OPHASCHAROENSUK, V.; et al. Osteopontin: a molecule for all seasons. **Q J Med**, [S.I.] v. 95, p. 3-13, 2002.

MBURU, J. N.; EINARSSON, S.; LUNDEHEIM, N.; Rodriguez-Martinez, H. Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. **Anim Reprod Sci**, [S.I.] v. 45, p. 109–21, 1996.

MCMICHAEL, A. J., POWLES, J. W., BUTLER, C. D. et al. Food, livestock production, energy, climate change, and health. **The lancet**, Australia, v. 370, n. 9594, p. 1253-63, 2007.

MIES-FILHO, A.; MEYERS, S. A.; TABLIN, F. et al. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? In: PROCEEDINGS OF A WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS., 2003 Brewster. **Resumos dos trabalhos**. R & W Publications (Newmarket) Ltd, 2004. p. 70-73.

MISSIO, D.; FOLCHINI, N. P.; LEIVAS, F. G. et al. Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. **Animl Reprod Sci**, [S.I.] v. 192, p. 146-53, 2018.

MIKKOLA, M.; TAPONEN, J. Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle. **Theriogenology**, [S.I.] v. 87, p. 135-140, 2017.

MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L. et al. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, [S.I.] v. 71, n. 3, p. 450–7. 2009.

MOCE, E.; GRAHAM, J. K.; SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserver bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, New York, v. 66, p. 929-936, 2006.

MOUGUELAR, H.; DÍAZ, T.; BORGHI, D. et al. Morphometric study of the mare oviductal mucosa at different reproductive stages. **The Anatomical Record**, [S.I.] v. 298, n. 11, p. 1950-1959, 2015.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A. et al. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J Androl**, [S.I.] v. 27, p. 201-211, 2006.

MYLES, D. G.; KOPPEL, D. E.; PRIMAKOFF, P. Sperm surface domains and fertilization. In: BAVISTER B. D.; CUMMINS, J.; RHOLDAN E. R. S. **Fertilization in Mammals**, Serono Symposia: Norwell, 1990.

OLIVERA, M.; RUIZ, T.; TARAZONA, A. et al. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. **Rev Col Cienc Pec Vol**, [S.I.] v. 19, n. 4, p. 426-436, 2006.

ORR, T. J.; ZUK, M. Reproductive delays in mammals: an unexplored avenue for post-copulatory sexual selection. **Biological Reviews**, [S.I.] v. 89 n. 4, p. 889-912, 2014.

PARRISH, J. J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, [S.I.] v. 81, n. 1, p. 67-73, 2014.

PEREIRA, R. J. T. A.; TULI, R. K.; WALLENHORST, S. et al. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A 23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. **Theriogenology**, [S.I.] v. 54, n. 2, p. 185-192, 2000.

PERO, M. E.; KILLIAN, G. J.; LOMBARDI, P. et al. Identification of osteopontin in water buffalo semen. **Reprod Fertil Dev**, [S.I.] v. 19 p. 279, 2007.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. **Micron**, [S.I.] v. 37, p. 597-612, 2006.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT; A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comp Biochem Physiol**, [S.I.] v. 46, p. 541-549, 1973.

PULKKINEN, M. O. Oviductal function is critical for very early human life. **Ann Med**, [S.I.] v. 27, p. 307-310, 1995.

PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. **Anim Reprod Sci**, [S.I.] v. 93, p. 114-123, 2006.

RAVNIK, S. E.; ZARUTSKIE, P. W.; MULLER, C. H. Lipid transfer activity in human follicular fluid: relation to human sperm capacitation. **J Androl**, [S.I.] v. 11, n. 3, p. 216-26, 1990.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell Tissue Res**, [S.I.] v. 322, n. 1, p. 43-52, 2005.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, [S.I.] v. 63, n. 2, p. 514-535, 2005.

ROSADA, A.; HICKS, K.; REYES, A. et al. Capacitation in vitro of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. **Fertil Steril**, [S.I.] v. 25, p. 821-824, 1974.

ROUX, C.; TRIPOGNEY, C.; JOANNE, C.; BRESSON, J. L. Qualité nucléaire du spermatozoïde humains (protéines nucléaires). **Gynécologie Obstétrique e Fertilité**, [S.I.] v. 32, p. 792-798, 2004.

SALES, J. N.; NEVES, K. A.; SOUZA, A. H. et al. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, New York, v. 76, p. 427-435, 2011.

SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificial inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal reproduction**, Belo Horizonte, v.1, p. 86-90, 2004.

SCALDELAI, P. R. R.; BERTOZZO, B. R.; SHIROMA, M. Y. M. et al. Veterinária em Foco. **Canoas**, [S.I.] v. 7, n. 2, p. 108-123, 2010.

SEIDEL, G. E., JR. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology**, [S.I.] v. 59, p. 585-598, 2003.

SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R.V. **Germ cells and fertilization**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. p. 63-101.

SINGH, B. K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei, 2006.

SUMRANSAP, P.; TUMMARUK, P.; KUNAVONGKRIT, A. Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. **Reproduction and Domestic Animals**, [S.I.] v. 42, p. 113–117, 2007.

ŠŤASTNÝ, P.; ŠŤASTNÁ, D.; ŠIMKO, M. et al. Morphological changes of oviduct in postnatal development and in oestrous cycle of heifers. **Acta Fytotechnica et Zootechnica**, [S.I.] v. 16, n. 4, p. 90-98, 2013.

SOUZA, C. E.; MOURA, A. A.; MONACO, E. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal reproduction Science**, [S.I.] v. 105, p. 72-89, 2008.

SOUZA, F. F.; CHIRINEA, V. H.; MARTINS, M. I. et al. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. **Reprod Domest Anim**, [S.I.] v. 44, p. 283-286, 2009. Supplement 2.

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: DE JONGE, C.; BARRATT, C. **The sperm cell production, maturation fertilization**

regeneration. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p. 1–30. 2006.

TALBOT, P.; SHUR, B. D.; MYLES, D. G. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. **Biol Reprod**, [S.l.] v, 68, p, 1-9, 2003.

TEIJEIRO, J. M.; MARINI, P. E. The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro - AKAP4 phosphorylation. **Reproduction**, [S.l.] v. 143, p. 773–785, 2012.

TALEVI, R.; GUALTIERI, R. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. **Theriogenology**, [S.l.] v. 73, n. 6, p. 796-801, 2010.

TESARIK, J. Topographical relations of intramembrane particle distribution patterns in human sperm membranes. **J Ultrastruct Res**, [S.l.] v. 89, n. 1, p. 42-55. 1984.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol Reprod**, [S.l.] v, 59, n. 1, p, 1-6, 1998.

WAI, P, KUO P. C. The role of osteopontin in tumor metastasis. **J Surg Res**, [S.l.] v. 121, p. 228-241, 2004.

WALES, R. G.; WHITE, I. G. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. **J Endocrinol**, [S.l.] v. 19, p. 211-220, 1959.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, [S.l.] v. 60, p. 481-492, 2000.

WAHEED, M. M.; EL-BAHR, S. M.; AL-HAIDER, A. K. Influence of seminal plasma antioxidants and osteopontin on fertility of the Arabian horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S.l.] v. 33, p. 705–709, 2013.

WAHEED, M. M.; GHONEIM, I. M.; ALHAIDER, A. K. Seminal plasma and serum fertility biomarkers in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**, [S.l.] v. 83, p. 650–654, 2015.

WEBER, G. F.; ASHKAR, S.; GLIMCHER, M. J. et al. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontina (Eta-1). **Science**, [S.l.] v. 271, p. 509-512, 1996.

WERNER, R. P. **Patologia geral veterinária aplicada**. São Paulo: Roca, 2010.

YANAGIMACHI, R.; OKADA, A.; TUNG, K. S. Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. **Biol Reprod**, [S.l.] v. 24, n. 3, p. 512-8, 1981.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, 189-317, 1994.

YÁNIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P. et al. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. **Anat Rec**, [S.I.] v. 260, p. 268-278, 2000.

YESTE, M.; CASTILLO-MARTÍN, M.; BONET, S. et al. Direct binding of boar ejaculate and epididymal spermatozoa to porcine epididymal epithelial cells is also needed to maintain sperm survival in in vitro co-culture. **Animal reproduction science**, [S.I.] v. 131, n. 3-4, p. 181-193, 2012.

ZHANG, G. M.; LAN, S.; JIA, R. X. et al. Age-associated and tissue-specific expression of osteopontin in male Hu sheep reproductive tract. **Tissue and Cell**, [S.I.] v. 48, n. 5, p. 496-502, 2016.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN: 0093-691X, ranqueada
como A2 pelo QUALIS-CAPES de 2017

<https://www.journals.elsevier.com/theriogenology>

Association of bovine sperm with OPN improves *in vitro* embryo production.

**Associação de espermatozóides bovinos com OPN melhora a produção *in vitro* de
embriões.**

School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brazil

*Correponding author: Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária,
FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rua Prof.
Dr. Walter Maurício Correa s/nº, Unesp Campus de Botucatu, 18618-681, Caixa Postal
560, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: dellaquajunior@uol.com.br

ABSTRACT

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 marker of high fertility. Similarly, studies show a higher rate of *in vitro* fertilization when it is implemented in fertilization médium. This study aims to determine the effect of the addition of different concentrations of OPN on bovine sex-sorted sperm by flow cytometry to determine viability, membrane integrity and sperm capacitation, *in vitro* sperm binding to uterine -cells test to quantify the number of sperm attached to the epithelium (explants) - forming what would be *in vivo* the spermatic reservoir- and *in vitro* embryo production (IVEP). In conclusion, our study showed by the flow cytometry and binding test that an incubation time with OPN greater than 30 minutes is required to achieve saturation of the glycoprotein and thus observe an effect on spermatozoa. In the same way that it interacts with oocytes, it has also been proven that OPN can have a direct association when it is directly incubated with spermatozoa, acquiring better *in vitro* fertilization rates and, therefore, better embryo development in cattle.

Key words: *in vitro* fertilization, blastocyst, uterine tube, seminal plasma.

49 **1. Introduction**

50 Since wider commercial application of bovine sex-sorted sperm separated by flow
 51 cytometry, several discussions have arisen on fertility rates *in vivo* and *in vitro*, as
 52 compared with non-sorted sperm [1-8]. The flow cytometry induces damages in the
 53 sperm cells by altering the membrane protein, inducing increased capacitation and
 54 acrossomal reaction [9,10]. These damages alter the spermatozoa lifetime and their bond
 55 to the uterine tube reservoir, decrease pregnancy rates after artificial insemination (IA)
 56 [11,12] and *in vitro* embryo production (IVEP) than non-sorted sperm [8-17].

57 *In vivo*, sperm functions are modulated by physical and biochemical interactions
 58 with the reproductive tract fluids [18]. This fluid composition influences fertilization
 59 process [19,20] by regulation oocytes transport to the ampule and sperm binding to the
 60 uterine tube epithelium, in order to form the spermatozoa reservoir [21-23]. The reservoir
 61 prolongs sperm lifetime, delays the capacitation process [8,24-26] and has an enzymatic
 62 and non-enzymatic antioxidant system which inhibits the reactive oxygen species (ROS),
 63 protecting the spermatozoa [27,28].

64 Uterine tube fluids have multiple effects on the gametes, which motivated the
 65 research on its components [20,29]. These components include several glycoproteins,
 66 with adhesive properties, which could be the responsible for the reservoir formation
 67 within the isthmus, although the molecular interaction mechanism for the reservoir
 68 formation is unclear. One of this glycoproteins which has been showed being fundamental
 69 regarding both, male and female reproductive processes is the osteopontin (OPN). The
 70 OPN is an acid glycoprotein, also known as secreted phosphoprotein 1 (SPP1), and is
 71 involved in cellular adhesion processes, sperm capacitation, gametes fusion, fertilization,
 72 embryo development, polyspermia block, maternal recognition and embryo implantation
 73 [30-37]. In addition, OPN in high concentration in the seminal plasma from several

species have been correlated with male increased fertility indexes [30,39-43]. In this sense, our hypothesis is that the effect of OPN is dose dependent. Then, this study aimed to identify if the addition of OPN to sperm improves sperm viability by increasing the union of these to uterine cells and the efficiency of IVEP.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All reagents used in the study including OPN were highest purity grade purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, São Paulo, Brazil), unless otherwise cited. Osteopontin (O3514) of 60 KDa was diluted in TCM 199 medium.

2.2. Experimental design

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals in Research of the FMVZ–UNESP (Permit number: 0145/2015–CEUA). The experiment was conducted at the LANÇA laboratory, at School of Veterinary Medicine and Animal Science, at São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

For the presente study, three experiments were designed to evaluate the effects of adding OPN to sex-sorted and non-sorted sperm. Commercial semens straws (0.25 mL) from four Nellore bulls were used for all experiments. Each bull had three type of semen straws: Y sorted, X sorted and non-sorted sperm. Each straw was thawed at 37 °C for 30 s, then divided into four microtubes with equal sperm concentrations, and incubated for 30 min with OPN at 37.5° C, 5% CO₂ and 100% humidity. Four concentrations of OPN were used in each experiment: 1: OPN 0 µg/1 x 10⁶ spermatozoa (control), 2: OPN 0.1 µg/ 1 x 10⁶ spermatozoa, 3: OPN 0.5 µg/ 1 x 10⁶ spermatozoa and 4: OPN 1.0 µg/ 1 x 10⁶

spermatozoa. In the experiment I, sperm death, sperm membrane integrity and sperm capacitation were evaluated by flow cytometry. In the experiment II, was evaluated the ability of sperm to attach to uterine cell explantes and, subsequently in experiment III, IVEP efficiency was tested. For each experiment, three replicates per bull (four bull) were used: Y sorted, X sorted and non-sorted sperm.

103

104 2.2.Sperm assessment for flow cytometry

One type of semen straw per animal was randomly selected, until processing the three types of straw of each bull. Straws were thawed at 37° C for 30 s, then the sperm concentration was estimated by hemocytometer (Neubauer chamber) and motility was subjectively evaluated. Straws with motility lower than 30% were replaced. The content of the straw was divided equally in four microtubes and treateds with four OPN concentrations as described in experimental design section.

After 30 min of incubation of the spermatozoa with the OPN, the samples were analyzed by flow cytometry (Experiment I). For this, cells were analyzed using a BD LSRFortessa™ cell analyzer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). A minimum of 1×10^4 cells per sample were analyzed and the data were generated using graphics dplot (axis < 0, bi-exponential) and evaluated with the software BD FACSDiva™ v6.1.

All sperm events were identified with Hoechst fluorescence. Acquisitions were discontinued after recording 10,000 Hoechst positive events. Three cells populations were identified and classified: injured cells (PI+YOPRO- and PI+YOPRO+); integrity cells (PI-YOPRO-) and capacitated cells (PI-YOPRO+).

121

122 *2.3. Collection and cryopreservation of uterine cells*

123 Complete reproductive tract of Nellore heifers presenting ovaries without corpus
 124 luteum (CL) were obtained from slaughterhouse. Uterine tube dissected were placed in a
 125 15 mL falcon tube containing Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), 3% v/v
 126 streptomycin-penicillin (PenStrep 15140122, GYBCO® life by Technologies, São Paulo,
 127 Brazil) and 2.4% v/v amphotericin B (fungizone 15290018, GYBCO® Life by
 128 Technologies, São Paulo, Brazil) and transported at 4 °C to the laboratory.

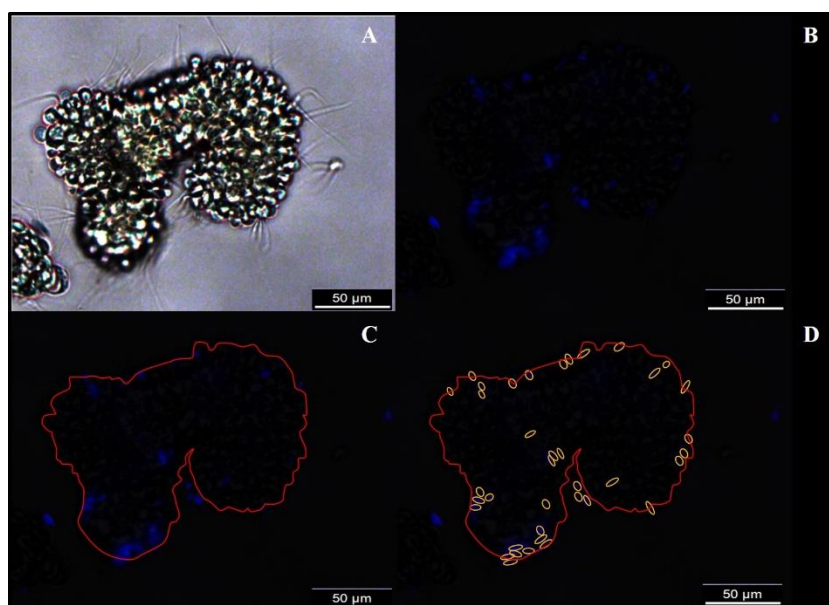
129 The uterine tubes were washed and the surrounding tissues was removed.
 130 Immediately, the uterine tube was seccioned from uterotubal junction up to 1 cm before
 131 the ampulla. With an intravenous catheter attached to a syringe with DPBS, the ampulla
 132 lumen was cannulated, massaged and washed for obtain the epithelial cells. The obtained
 133 material was centrifuged at 600g for 10 min and washed with DPBS (2x). Viability and
 134 cellular concentration were calculated by hemocytometer (Neubauer chamber).the pellet
 135 formed was cryopreserved in 1:2 of TCM 199 and fetal calf serum (FCS), and 10% v/v
 136 of DMSO (C6164) solution. Cryotubes were stored in a controlled cooling container (Mr.
 137 Frosty, Nalgene, USA) in -80 °C freezer for 24 h and then transferred to liquid nitrogen
 138 container at -196 °C, until used.

139

140 *2.4. Thawed and cellular culture of uterine cells*

141 Cryopreserved samples were removed from liquid nitrogen and thawed at 37.5° C
 142 in dry bath. The sample was suspended in TCM 199 medium previously heated for 30
 143 min. It was centrifuged at 600g for five min (2x), the supernatant was discarded and the
 144 pellet was plated in 20 mL of stabilized culture médium in the petri dish. Culture medium
 145 was composed of 90% v/v TCM 199 without HEPES, 10% v/v of FCS, 1.5% v/v
 146 streptomycin penicillin and 1.2% v/v amphotericin B. Cells were cultured at 37.5° C, 5%

147 CO₂, and 100% humidity. After 24 h of culture, cells were examined and the clusters that
 148 formed tubular coarse aggregates (explants) with ciliary movement were selected (Fig.
 149 1).



151 **Fig. 1.** Phase contrast images and fluorescence labeling showing sperm-binding assay to
 152 explantes after 30 min of incubation in the experimente II. A) Phase contrast image, (B,
 153 C, D) image with fluorescence showing the nucleus of sperm in blue, (C) perimeter of the
 154 explant delimited by a red line and nucleus of sperm in blue and (D) perimeter of the
 155 explantes in red and head of the spermatozoa in yellow circles to count and calculate
 156 the number of sperm bound per 0.01 mm² of explant. (20x magnification)

158 2.5. *In vitro* sperm-binding assay to uterine cells (experiment II)

159 The semen straws were selected and thawed in the same way as in experiment I.
 160 One single straw of each type and each bull was used for the sperm-binding assay to
 161 uterine cells. After thawing, the sperm concentration was estimated by hemocytometer
 162 (Neubauer chamber) and motility was subjectively evaluated. Straws with motility lower
 163 than 30% were replaced. The content was deposited in a microtube with probe Hoechst

164 33342 (5 μ m/mL) as described by Philip et al. (1996). The sperm cells samples were
165 layered on top of a Percoll gradient containing 200 μ L of 90% Percoll and centrifuged
166 (MiniSpin ® Eppendorf, Hamburg, Germany) at 300g for five min, the supernatant was
167 discarded and the pellet resuspended in 200 μ L Tyrode albumin lactate pyruvate (sperm
168 TALP) to determine sperm concentration. The sample was divided in four microtubes,
169 containing 2×10^5 spermatozoa per microtubes and treated with OPN for 30 min as
170 described in experimental design section.

171 After co-incubation with OPN, the samples were incubated in two petri dishes per
172 bull/straw previously assembled, using two incubation times: 15 (T45) and 30 (T60) min
173 (This second incubation time was of sperm cells co-incubated with OPN and the
174 explants). Each dish contained 4 drops composed by 60 μ L of sperm TALP medium,
175 supplemented with 22 μ g/mL pyruvate and 50 μ g/mL gentamicin, overlaid with mineral
176 oil, 15 explants and 1×10^6 spermatozoa/mL previously incubated with the OPN. The
177 petri dish was incubated at 37.5° C, 5% CO₂ and 100% humidity until evaluation.

178 Thus, explant-sperm complexes (ESC) was washed (3x) with sperm TALP medium
179 to remove non-binding spermatozoa. Five ESC of each group were transferred to a slide
180 for analysis. For each ESC, five pictures were taken at different depths due to the three-
181 dimensional format of the explants. Images were acquired (20x magnification) using an
182 inverted microscope (Leica® DMI3000B, Heidelberg, Germany) with digital camera
183 coupled. Binding-spermatozoa number and explant area was quantified by ImageJ
184 software. Number of spermatozoa per square millimeter (0.01 mm²) of explant was
185 calculated.

186

187

188 2.7. *In vitro* embryo production

189 By experiment III, ovaries from slaughterhouse were transported to the laboratory
190 in saline solution (0,9% NaCL) supplemented with penicillin G (100 IU/mL) and
191 streptomycin sulfate (100 µg/mL) at 35 ° C. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were
192 aspirated from three to eight mm diameter follicles with an 18-gauge needle and pooled
193 in 15 mL conical tube. After sedimentation, COCs were recovered and selected using a
194 stereomicroscope. Only COCs with homogenous cytoplasm and at least three layers of
195 cumulus cells were used.

196 For *in vitro* maturation, COCs previously selected were incubated in maturation
197 medium for 24 h at 38.5° C, 5% CO₂ and 100% humidity. Maturation medium consisted
198 of TCM 199, 10% de FCS (F2442), 0.2 mM pyruvate (P4562), 1 µg/µL FSH (Foltropin-
199 V®, Agener, São Paulo, Brazil), 5 µg/µL LH (Chorulon® 5,000UI, MSD, São Paulo,
200 Brazil), 16.6 mg/µL amikacin (K1377) and 1 µg/mL estradiol (E2758). After maturation,
201 COCs were transferred to a petri dish containing 4 drops of fertilization médium.
202 Fertilization medium consisted of sperm TALP medium, 10 µg/mL heparin (H3149), 22
203 µg/mL pyruvate (P4562), 50 µg/mL gentamicin (G1397), 6 mg/mL bovine serum albumin
204 (BSA) without fatty acids (A6003) and PHE solution: 2 µM penicillamine (P4875), 1 µM
205 hypotaurine (H1384) and 0.25 µM epinephrine (E4250) under mineral oil. Each drop
206 contained 60 µL of fertilization medium and 15 COCs.

207 For *in vitro* fertilization (IVF), a pool of three straws of each type and bull was used
208 to reach an adequate concentration of sperm. The straws were selected randomly and
209 thawed as already described in Experiments I and II. After thawing the sample was
210 layered on top of a Percoll gradient (P4937) 45/90% and centrifuged at 5,500g for five
211 min. The pellet was washed in 200 µL sperm TALP medium at 1,400g for three min and
212 suspended to 200 µL with sperm TALP medium. Sperm concentration was determined

213 by Neubauer chamber and 2×10^5 spermatozoa was divided in four samples and treated
 214 with OPN as described in experimental design section. After the incubation of the sperm
 215 with the OPN (30 min), the sperm cells were transferred to the IVF drops (final
 216 concentration: 1×10^6 spermatozoa/mL). The spermatozoa with their respective
 217 concentration of OPN and COCs co-culture were incubated at 37.5 ° C, 5% CO₂ and
 218 100% humidity for 20 h. This development stage was considered as day zero (Day 0).

219 After 20 h, presumptive zygotes were removed, washed, transferred for droplets
 220 with culture medium in petri dishes and cultured for 9 d. Presumptive zygotes were
 221 evaluated on 3 d for cleavage, and on 9 d for blastocyst rate (expanded blastocyst,
 222 hatching blastocyst and hatched blastocyst) for each group.

223

224 2.8. Statistical analysis

225 The parametric assumptions were assessed using the Levene (homoscedasticity)
 226 and Kolmogorov-Smirnov (normality) tests. Data were log or square root transformed to
 227 attain normality and analyzed using PROC MIXED procedure with a repeated statement.
 228 The statistical model included the fixed effect of OPN (four groups), sperm type (sex-
 229 sorted or non-sorted), incubation time and their interaction. The Tukey-Kramer test for
 230 the comparison of means was used in cases in which a factor or interaction was
 231 significant. The model was fitted to the data using the maximum likelihood method. The
 232 best matrix was identified using Akaike's information criterion, so the lower the value
 233 was, the better the fit of the model in question. Results were reported as the means $\pm$
 234 standard error (SEM) in original scale, and differences were considered significant at $P \leq$
 235 0.05. The Pearson's correlation coefficient was used for testing the relationship between
 236 certain variables. The results are presented as correlation coefficients (r), and differences
 237 were considered significant when $P \leq 0.05$. Simple polynomial and linear regressions

238 were tested using PROC GLM to establish the correlation between the OPN concentration
239 and the development percentage of *IVEP* to cleavage and blastocyst stages. The models
240 were fitted according to the significance of the regression coefficients ($P \leq 0.05$) and
241 according to the coefficients of determination (R^2). All statistical analyses were
242 performed using SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

243

244 **3. Results**

245 *3.1. Sperm assessment for flow cytometry*

246 The parameters evaluated by flow cytometry showed no interaction in the different
247 concentrations of OPN. Although differences between the types of semen straw (Y and
248 X sex-sorted or non-sorted) were observed. Non-sorted sperm showed higher percentage
249 of sperm with membrane integrity and lower dead sperm percentage than the sex-sorted
250 sperm. (Fig. 2). Similarly, difference between bulls was observed (Table 1).

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

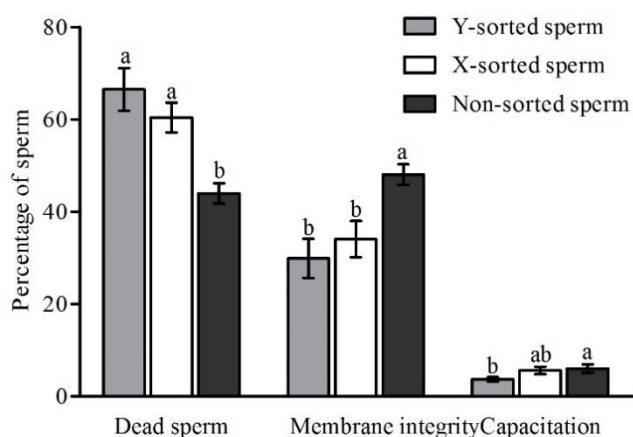


Fig. 2. Percentage of dead sperm, membrane integrity and capacitated sperm after 30 min of co-incubation of the OPN with Y-sorted, X-sorted and non-sorted sperm. Data represent mean percentage $\pm$ standard error. In the figure all the bulls and OPN concentrations studied were unified (n=16). ^{a,b} Different letters indicate differences between Y-sorted, X-sorted and non-sorted sperm within of same status in the flow cytometry (dead sperm, membrane integrity or capacitated) ($P \leq 0.05$).

Table 1

Mean $\pm$ standard error of the mean the status assessment by flow cytometry in each bull, without differentiating the concentrations of OPN and the type of semen straws.

Bull	Dead sperm (%)	Membrane integrity (%)	Capacitated (%)
A	46.09 $\pm$ 1.63 ^b	47.48 $\pm$ 1.62 ^b	6.44 $\pm$ 0.60 ^a
B	52.51 $\pm$ 0.67 ^a	42.13 $\pm$ 0.95 ^{ab}	5.36 $\pm$ 0.53 ^a
C	68.62 $\pm$ 2.42 ^a	29.00 $\pm$ 2.22 ^a	1.60 $\pm$ 0.40 ^b
D	68.84 $\pm$ 7.16 ^a	24.23 $\pm$ 6.86 ^a	6.44 $\pm$ 1.07 ^a

^{a,b} Different letter superscripts in row mean significant difference ($P < 0.05$).

3.2. *In vitro* sperm-binding assay to uterine cells

There was no interaction between the different concentrations of OPN, incubation time (T45- T60), bull or type of semen straw on *in vitro* sperm-binding assay to uterine cell (Fig. 3). Nevertheless, the OPN decreased the sperm number attached to explants ($P = 0.004$).

3.3. *In vitro* embryo production

There was no interaction between the bull or sperm type on *in vitro* embryo production. The percentage of oocytes cleaved at D3 was 48.0%, 45.4% and 46.6% in non-sorted, Y-sorted and X-sorted sperm, respectively. Moreover, the blastocyst percentage at D 9 was 25% in non-sorted, 15.4% Y-sorted and 18.6% X-sorted sperm.

OPN 0.5 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ spermatozoa group showed greater cleavage and blastocyst than other concentration with $P = 0.043$ (Fig. 4).

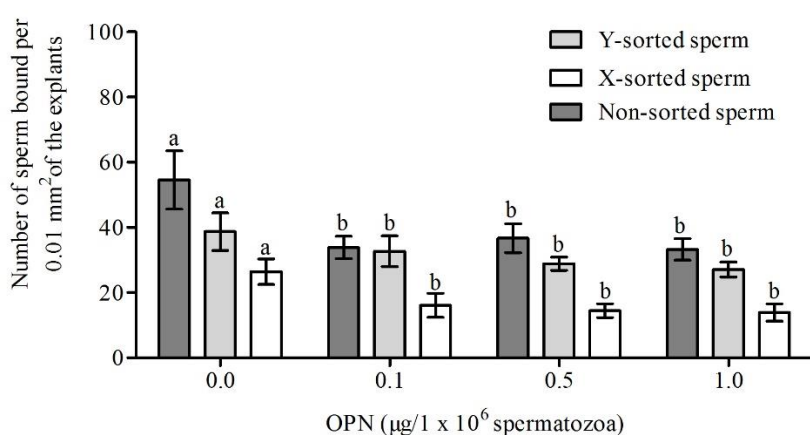
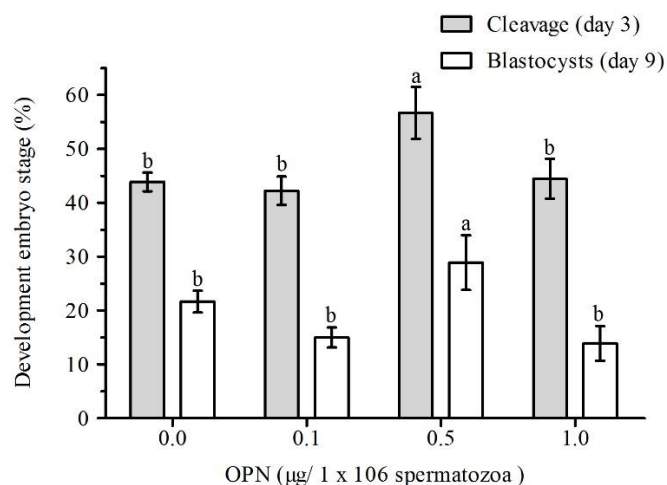


Fig. 3. Mean $\pm$ standard error of the mean the number of sperm bound per 0.01 mm² of uterine cells after co-incubation of the explants (n=40) with Y-sorted, X-sorted and non-sorted sperm in different concentrations of OPN. The bulls and the incubation time whit OPN were unified in this figure. ^{a,b} Different letters indicate significant differences between each OPN concentration in the same sperm type ($P < 0.05$).



298

299 **Fig. 4.** Mean $\pm$ standard error of the mean the cleavage and blastocyst percentage in
 300 different OPN concentration groups (n=180 oocytes). ^{a,b} Different letters indicate
 301 significant differences between each OPN concentration in the same development embryo
 302 stage (P < 0.05).

303

304 4. Discussion

305 Since the development of sex-sperm, it believed that the low pregnancy rate was
 306 related to the decreased sperm concentration in straw/insemination. However, a study
 307 using concentrations of 2.1, 3.5 or 10×10^6 sperm/insemination of sex-sorted and non-
 308 sorted sperm, and observed that regardless of the dose, the conception rate was higher in
 309 non-sorted sperm [5,44]. Similarly, it has been also observed during IVEP, where the
 310 fertility for sex-sorted sperm remained lower than non-sorted [45], demonstrating that
 311 there are other factors that alter the lifetime of the spermatozoa, like their ability to bind
 312 *in vivo* to the uterine epithelial cells and their *in vitro* capacitation process [46]

313 The *in vitro* capacitation depends of the incubation time and the heparin
 314 concentration in the fertilization médium, 10 to 20 µg/mL [38]. Nevertheless, studies
 315 identified that OPN, alone or in combination with heparin, improves viability and

316 increases sperm capacitation [35,36]. Given the various functions of OPN, we
317 hypothesize that the effect of OPN is dose-dependent and co-incubating the sex-sorted
318 and non-sorted sperm with the protein for 30 min, would improve the sperm viability by
319 increasing the sperm binding to uterine cell explants and improve the percentages of
320 IVEP.

321 In flow cytometry analysis, it was observed that the different concentrations of OPN
322 did not influence either the sperm viability or membrane integrity. However, the non-
323 sorted sperm have greater viability and integrity of the membrane, compared to the sex-
324 sorted sperm. In fact, the sex-sorting process affects the structural characteristics of
325 bovine sperm [4] and promotes damage of the plasma membrane, which induces
326 capacitation [47] and compromises the acrosome reaction [11].

327

328 The sperm reservoir in uterine cell prevents the sperm capacitation [50,51] helping
329 to keep viable cell in the female reproductive tract and synchronizing their release with
330 ovulation [52]. Reservoir formation depends of the integrity of the sperm membrane [53-
331 55], moreover, the decreased *in vivo* fertility of sex-sorted sperm is associated with
332 reduced ability to bind or remain attached to the uterine epithelial cells, since the greater
333 the number of sperm in the reservoir (for up to 20 h), greater the probability of the cows
334 not returning to heat [56].

335 In our study, the *in vitro* model of the reservoir was the explant, since the monolayer
336 culture loses structural and biochemical characteristics [57] and it is not a suitable culture
337 type to perform functional tests [46]. Co-incubation of the OPN to the sperm cells (0.1,
338 0.5 and 1.0 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ spermatozoa) showed a decrease in the number of sperm attached
339 to the explant comparing with OPN 0.0 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ spermatozoa, supporting its role in the
340 sperm capacitation [35,36]. In addition, it was observed that non-sorted sperm had higher

percentage of sperm attached to explants than sex-sorted sperm, which can be associated with the greater damage of sex-sorted sperm [46].

Likewise, a greater sperm binding to the explants was evidenced in the Y-sorted sperm 32%, than X-sorted sperm 18%, similar with other studies where a greater sperm attached to the explants was evidenced in the Y-sorted sperm [46], and a lower number of spermatozoa attached to the zona pellucid after 48 h of incubation for the X-sorted sperm [65]. It confirms the existence of differences related to the longevity between Y-sorted and X-sorted sperm, suggesting that the cells of the uterine tuba detect subtle differences between genders (64), being able to bias the gender of the offspring.

In vitro embryo production provides greater fertility rate for sex-sorted semen than artificial insemination, because all the semen is applied directly to the drop containing the oocytes. However, several studies have shown that this fertility rate is lower than non-sorted sperm. Moreover, these studies also reported lower cleavage and blastocyst rates, 20% and 40%, respectively [13,66,67,68]. We hypothesized that the addition of OPN, would improve these rates in the sex-sorted sperm, but unfortunately, no difference was observed between the sex-sorted and non-sorted sperm.

The OPN 0.5 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ spermatozoa group showed higher cleavage and blastocyst percentage compared with the other OPN concentrations. Interestingly, these results differed from other previous studies, which showed increased cleavage and blastocyst percentage using 0.1 μg OPN [34] or even higher at 10, 20, 40 and 100 μg OPN concentrations [33,35]

It is speculated that the OPN origin and purity influence its effectiveness explained different results between the species [36]. In our study, OPN was obtained from highly purified bovine milk, different of Gonçalves et al. [33] and Monaco et al. [35], in which the OPN was purified from raw or skimmed milk from cattle, with decrease purity index,

366 requiring higher concentrations to achieve an effect. Hao et al. [34] used recombinant
 367 OPN extracted from mice in a lower concentration, which supports our hypothesis that
 368 the origin and purity of the OPN can generate different results. Despite this, the study was
 369 conducted in buffaloes using OPN from highly purified bovine milk to treat non-sorted
 370 sperm and showed higher cleavage and blastocyst rates, in the 0.1 and 1.0 µg OPN
 371 concentrations [36]. These results disagree with ours, however for this study, , non-sorted
 372 sperm was used and the oocytes were incubated with OPN, besides the buffaloes have
 373 decreased OPN concentration in seminal plasma [36].

374 In conclusion, our study showed that independent of the OPN concentration
 375 implemented, the viability and integrity of the sperm membrane were not affected when
 376 evaluated by flow cytometry. The concentration of OPN (60Kda) 0.5 ug / 1 x 10⁶
 377 spermatozoa, increases sperm capacitation, decreasing the sperm binding to epithelial
 378 cells explants and increasing the rate of IVEP and embryonic development.

379

380 **References**

- 381 [1] Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, et al.
 382 Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially
 383 inseminated with X-sorted or unsorted sperm. Anim Reprod Sci 2004;1:86–90.
- 384 [2] Bodmer M, Janett F, Hassig M, Daas N den, Reichert P, Thun R. Fertility in
 385 heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted
 386 sperm under field conditions. Theriogenology 2005;64:1647–55.
- 387 [3] Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. Pregnancy Rates in
 388 Lactating Holstein – Friesian Cows after Artificial Insemination with Sexed
 389 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 rebecca 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.

- 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. [Ca^{2+}] 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 Ca^{2+}
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 Ca^{2+} 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] Trigo 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.