UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LUANA DA ROSA CELIN

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DOS ESPERMATOZOIDES SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM AGREGADOS DE CÉLULAS EPITELIAIS DA TUBA UTERINA BOVINA

ALEGRE – ES
2019

LUANA DA ROSA CELIN

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DOS ESPERMATOZOIDES SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM AGREGADOS DE CÉLULAS EPITELIAIS DA TUBA UTERINA BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.
Orientador: Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto.
Co-orientadora: Dra. Margot Alves Nunes Dode.

ALEGRE – ES

2019

LUANA DA ROSA CELIN

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DOS ESPERMATOZOIDES SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM AGREGADOS DE CÉLULAS EPITELIAIS DA TUBA UTERINA BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Dr. José de Oliveira Carvalho Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

_____

Drª. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo

_____

Drª. Michele Riciere Bastos
Veterinária Autônoma

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nesta caminhada e dar discernimento nas minhas decisões, por me proteger e me abençoar todos os dias.

Ao meu pai Luíz e minha irmã Lorena, por serem meu alicerce e sempre acreditarem nos meus sonhos junto a mim. Obrigada por todo o incentivo e compreensão. Aos meus amigos e familiares que sempre compreenderam meus momentos de ausência.

Ao meu orientador Dr. José de Oliveira Carvalho Neto, pela orientação, pelos ensinamentos diários. Pelos incentivos e estímulos. Obrigada por todas as oportunidades confiadas a mim e por me mostrar que sempre posso ir além do que imagino.

À minha co-orientadora Margot Alves Nunes Dode, por toda a ajuda, pela paciência e pela oportunidade dada de realizar o experimento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Ao Dr. Maurício Machaim Franco, pelos seus ensinamentos e sua paciência, obrigada por ser tão prestativo.

À Ligiane Oliveira Leme, que se tornou uma grande amiga além do laboratório, que esteve sempre tão prestativa em me ajudar.

À Andrielle Thainar Mendes, por me acolher e se dispor a ajudar no experimento.

À minha colega de quarto, Diandra Hoffman, que se tornou amiga, por aturar minhas lamentações e pela sua amizade. Obrigada por tudo.

Ao Vinícius Henrique de Souza, por todo apoio, que me retribuiu com tanto carinho nos momentos mais difíceis. Agradeço a Deus pois tive a sorte de encontrar você.

Aos meus amigos Carla Dalcin, Andréia Romanel, Lara Moraes, Jéssica Falçoni, Franciele Carrilho, Renato Picoli, Pablo Moraes, Hévila Dutra, Gisele Bitencourt, Maria Augusta, Thais Nunes e Bianca Botelho que mesmo de longe me fizeram sentir tão perto deles, me apoiando e acreditando em mim. Eu amo vocês.

À minhas amigas Taynan Kawamotto, Andressa Jalyne e Thaís Preisser que sempre estiveram ao meu lado me dando força, apoio, amizade, conselhos. Obrigada por estarem na minha vida, estarão sempre no meu coração.

Aos amigos de laboratório Nayara Kussano, Felipe Caixeta, Letícia Barcelos, Isabella Grissi, Otávio Faria, Venâncio Augusto, Gabriela Fernandes e Andrei Fidelis. Obrigada por toda ajuda, pela amizade diária e pelos momentos de distração.

Aos pesquisadores Bianca Damiane Marques Silva e João Henrique Moreira Viana, pelo compartilhamento do conhecimento e ensinamentos científicos.

Aos funcionários, Sidney que se tornou um grande amigo; Rosângela por ser uma mãezona; Sr. Arlindo, Sancler, Urias e Normandes. Sem eles o dia-a-dia não seria possível.

A todos os professores e mestres, por dividirem seus conhecimentos.

Aos alunos da pós-graduação da UFES, pelo companheirismo e ajuda durante os dois anos de mestrado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todo o suporte para que este estudo fosse realizado.

Aos abatedouros Acaluz, Beef Nobre e Nipobraz por ceder material biológico, indispensável para a execução do experimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Universidade Federal do Espírito Santo, pelo curso oferecido.

“*A gratidão é a via que nos devolve à relação de amor com a vida. É a partir dela que nos livramos da pretensão de que falhamos, perdemos, retrocedemos. Munidos de espírito grato, seremos sempre capazes de compreender: A vida foi como podia ser. Então só nos resta agradecer.* ”

Padre Fábio de Melo.

RESUMO

CELIN, LUANA DA ROSA. **Avaliação *in vitro* do efeito dos espermatozoides sobre a expressão gênica em agregados de células epiteliais da tuba uterina bovina**. 2019. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

A interação entre espermatozoides e as células da tuba uterina garante a disponibilidade de espermatozoides viáveis e com maior potencial de fecundação. Estudos relacionados a ligação dos espermatozoides à tuba uterina, têm demonstrado que essa ligação influencia a transcrição e tradução de genes, promovendo a formação de um ambiente propício para a manutenção da viabilidade espermática. Objetivou-se, avaliar o efeito da concentração de espermatozoides e tempo de incubação com as células epiteliais da tuba uterina (BOEC) sobre a expressão relativa dos genes FUT 6, NQ01, CST6, B3GNT3, CKB, RARRES2, MIF e FOS. Para cada coleta das amostras, um pool de espermatozoides de seis touros foi incubado com agregados de BOEC nas concentrações de $1x10^3$ e $1x10^6$ spermatozoides/mL por 18h em estufa de cultivo celular, além dos grupos controle, sendo apenas com agregados celulares coletados no momento 0h e 18h. Posteriormente com base no resultado deste experimento, foi avaliado se a co-incubação por 3, 6 e 12h apresentava variação no nível de transcritos das BOEC. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Em relação à concentração espermática, não houve efeito sobre o nível relativo de transcritos dos genes RARRES2, MIF, CKB, CST6, B3GNT3 e NQO1 em relação ao controle 0h sem incubação. Para o gene FOS houve um aumento de sua expressão mediante o tratamento de $1x10^6$ espermatozoides/mL em 18h de co-incubação com as BOEC. Em relação ao tempo de incubação, apenas o gene MIF apresentou menor expressão após 12 h de co-incubação em relação ao momento 0 e 6 h. Baseado nesses resultados, conclui-se que a interação de espermatozoides e BOEC modula a expressão do gene MIF e FOS *in vitro*. Para os demais genes avaliados, não foi identificado efeito dos espermatozoides sobre o nível de transcritos.

Palavras-chave: transcritos. célula. interação

ABSTRACT

CELIN, LUANA DA ROSA. **In vitro evaluation of the effect of spermatozoa on gene expression in explants from bovine oviduct epithelial cell** 2019. 66p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

The interaction between spermatozoa and uterine tubal cells ensures the availability of viable spermatozoids with a higher fertilization potential. Studies related to sperm binding to the uterine tube have shown that this influence influences the transcription and translation of genes, promoting the formation of an environment conducive to the maintenance of sperm viability. The objective of this study was to evaluate the effect of sperm concentration and incubation time on the relative expression of the FUT 6, NQ01, CST6, B3GNT3, CKB, RARRES2, MIF and FOS genes. For each collection of samples, a sperm pool of six bulls was incubated with BOEC aggregates at concentrations of 1x103 and 1x106 spermatozoids / mL for 18h in a cell culture oven, in addition to the control groups, with only cell aggregates collected at time 0h and 6:00 p.m. Subsequently based on the result of this experiment, it was evaluated whether the co-incubation for 3, 6 and 12h presented variation in the level of BOEC transcripts. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the differences between means were compared by the Tukey test ($p < 0.05$). In relation to the sperm concentration, there was no effect on the relative level of transcripts of genes RARRES2, MIF, CKB, CST6, B3GNT3 and NQO1 in relation to the 0h control without incubation. For the FOS gene there was an increase of its expression by the treatment of 1x106 spermatozoa / mL in 18h of co-incubation with the BOEC. In relation to the incubation time, only the MIF gene presented lower expression after 12 h of co-incubation in relation to the moment 0 and 6 h. Based on these results, we conclude that the interaction of spermatozoa and BOEC modulates the expression of the MIF and FOS gene in vitro. For the other evaluated genes, no effect of spermatozoa on the level of transcripts was identified.

Key words: transcripts. cell. interaction

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 -	Dissecação da tuba uterina bovina.....	33
Figura 2 -	Fotografia em estereomicroscópio, faixa de zoom de 3x, de agregados celulares proveniente de células da tuba uterina incubados com espermatozoides.....	34
Figura 3 -	Esquema demonstrando o delineamento experimental dos experimentos I e II. Agregados de BOEC foram incubados com espermatozoides na concentração de $1x10^6$ espermatozoides/mL (CI) e na concentração de $1x10^3$ espermatozoides/mL (CII), além da gota controle (C) apenas com agregados celulares. No momento 0h sem incubação, 3 amostras de agregados foram coletadas e guardadas em freezer -80ºC. Posteriormente ao respectivo tempo de co-incubação (3, 6, 12 ou 18h, nas placas de cultivo de agregados celulares com espermatozoides), as amostras foram coletadas da mesma forma em micro tubos para posterior análise de PCR em tempo real.....	35
Figura 4 -	Níveis de abundância relativa (média ± desvio padrão) de RNAm dos genes FUT6, B3GNT3, NQ01, CKB, CST6, RARES 2, MIF e FOS em BOEC co-incubadas com duas diferentes concentrações espermáticas durante 18h e obtidos a partir de 5 réplicas biológicas. Os tratamentos incluem: a) Controle 0h (CTR 0h) b) Controle 18h (CTR 18h); c) co-incubação das BOEC com $1x10^3$/mL espermatozoides por 18 h (Sptz 10^3); d) co-incubação das BOEC com $1x10^6$/mL espermatozoides por 18h (Sptz 10^6).....	41
Figura 5 -	Níveis de abundância relativa (média ± desvio padrão) de RNAm dos genes FUT6, NQ01, CKB, CST6, RARES 2, MIF e FOS em BOEC co-incubadas com espermatozoides na	

concentração de $1x10^6$ espermatozoides/mL durante 0, 3, 6 e 12 h, e obtidos a partir de 5 réplicas biológicas..... 42

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

ADAM1b/ADAM2 – Desintegrina e metaloproteinase fertilina α e β
ANXA 1, 2, 4 e 5 – Anexina 1, 2, 4 e 5
PDC 109 ou BSPA1/A2 – Proteína seminal bovina A1/A2
FUT3 – α3-Fucosyltransferase-lll
FUT4 – α3-Fucosyltransferase-IV
FUT5 – α3-Fucosyltransferase-V
FUT6 – α3-Fucosyltransferase-VI
FUT7 – α3-Fucosyltransferase-Vll
FUT9 – α3-Fucosyltransferase-lX
B3GNT3 ou GnTlll – Acetilglucosaminiltransferase 3
AP-1 – Proteína ativadora do fator de transcrição-1
FSH – Hormônio folículo estimulante
LH – Hormônio luteinizante
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
C/EBPb – Proteína de ligação estimulante
Atat3 – Proteína de transcrição 3
NQO1 – NAD(P)H: Quinona oxidoredutase 1
DNA – Ácido desoxirribonucleico
CKB – Creatina kinase B
MIF – Fator Inibitório da Migração de Macrófagos
CT¨6 – Cistatina 6 ou cistatina M ou E/M
CHAMERIN ou RARRES2 – Receptor de ácido retinóico 2
CMKLR1 ou ChemR23 – Receptor quimiocina tipo 1
GPR1 – Receptor acoplado à proteína C1
CCRL2 – Receptor de quimiocina tipo 2
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
RNAseq – Sequenciamento de ácido ribonucleico
CO_2 – Dióxido de carbono
qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa
PCR real time – Reação em cadeia de polimerase em tempo real
NaCl – Cloreto de sódio

SOF – Fluido sintético do oviduto

DNase – Desoxirribonuclease

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ACTB – β-actin

PPIA – Peptidylprolyl isomerase A

BOEC – do inglês: bovine oviduct epithelial cells

P_4 – Progesterona

EROs – Espécies reativas de oxigênio

IgE – Imunoglobulina E

PGE_2 – Prostaglandina E_2

$PGF_{2\alpha}$ – Prostaglandina $F_{2\alpha}$

COX-2 – Ciclooxigenase-2

Ca2+ - Íon cálcio

LISTA DE SÍMBOLO

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

nM – Nanômetro

rpm – Rotação por minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

min – Minuto

h – Hora

UI – Unidade internacional

°C – Grau célsius

Fg – Fentograma

LISTA DE TABELAS

Tabela **Página**

Tabela 1 - Identificação do gene, sequência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb), concentração dos iniciadores, eficiência dos iniciadores e número de acesso ao Genbank..... 37

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESE.....	17
3. OBJETIVO.....	18
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
4.1 Anatomia e fisiologia da tuba uterina.....	19
4.2 Interação entre a tuba uterina e espermatozoides.....	20
4.3 Efeito dos espermatozoides sobre a tuba uterina.....	23
4.4 Cultivo *in vitro* de células epiteliais da tuba uterina.....	25
4.5 Genes selecionados.....	27
4.5.1 α3-Fucosyltransferase-VI (FUT6).....	27
4.5.2 Acetilglucosaminiltransferase 3 (B3GNT3).....	28
4.5.3 NAD(P)H: Quinona Oxidoredutase 1 (NQO1).....	28
4.5.4 Creatina Kinase B (CKB).....	29
4.5.5 Cistatina 6 (CST6).....	29
4.5.6 Receptor de ácido Retinóico 2 (RARRES2).....	29
4.5.7 Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF).....	30
4.5.8 FOS.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Coleta e processamento das células da tuba uterina.....	33
5.2 Seleção e concentração espermática.....	34
5.3 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	36
5.4 Delineamento Experimental.....	37
5.4.1 Experimento 1: Nível de transcritos das BOEC de acordo com a concentração espermática.....	38
5.4.2 Experimento 2: Nível de transcritos das BOEC de acordo com o tempo de interação com espermatozoides.....	38
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
7. RESULTADOS.....	41
8. DISCUSSÃO.....	44
9. CONCLUSÃO.....	51
10. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

No processo de reprodução por monta natural, poucos espermatozoides conseguem chegar ao local de fecundação, o qual ocorre na região da ampola na tuba uterina. Para isto, ocorre uma intensa seleção espermática ao longo da passagem dos espermatozoides pelo trato reprodutivo da fêmea (YANIZ et al., 2000). Este processo é mediado por múltiplos fatores, dentre eles as características anatômicas da tuba uterina, a qual é organizada em uma vasta rede de invaginações longitudinais (YANIZ et al., 2000).

Após passarem pela junção útero-tubárica, os espermatozoides iniciam um contato próximo com as células epiteliais da tuba uterina bovina (BOEC), interagindo com as mesmas devido a presença de moléculas da superfície da membrana plasmática dos espermatozoides com receptores presentes nas BOEC (SUAREZ, 2016). Desta forma, na tuba uterina, os espermatozoides podem permanecer ligados às BOEC, formando os reservatórios espermáticos, ou permanecerem livres em suspensão no fluido secretado pelas BOEC. Isto mantêm um ambiente propício para a manutenção da viabilidade espermática e fecundação (MILLER, 2015).

Embora o efeito da tuba uterina sobre os espermatozoides seja bem conhecido, o efeito dos espermatozoides sobre a tuba uterina, causando modificações na mesma, ainda não é totalmente elucidado, especialmente em animais de produção, como os bovinos. Estudos *in vivo* relacionados a esta avaliação, tornam-se complicados e limitados pela logística, devido ao alto custo de trabalho e dificuldade na realização. Isto porque, para a retirada da tuba uterina, é necessário o abate dos animais ou sua castração, os quais inviabilizam a reprodução das fêmeas bovinas. Neste sentido, outra forma de avaliar este efeito é através de estudos *in vitro* relacionados a esta interação, sendo que para isto, é necessário que as BOEC, durante o cultivo *in vitro* mantenham sua fisiologia de forma semelhante à sua fisiologia *in vivo*.

Estudos *in vitro* em suínos (ALDARMAHI et al., 2012, GEORGEOU et al., 2007), e *in vivo* em camundongos (FAZELI et al., 2004) e suínos (ALMINANA et al., 2014), relacionados a interação de espermatozoides e BOEC, têm demonstrado que os espermatozoides alteram a transcrição e/ou tradução de genes dessas células após a formação dos reservatórios espermáticos. Entretanto, até o presente momento, foi realizado apenas um estudo *in vitro* em bovinos, visando avaliar o efeito dos

espermatozoides sobre as BOEC. Kodithuwakku, Miyamoto e Wijayagunawardane (2007), avaliando este efeito em um estudo *in vitro*, demonstram que espermatozoides vivos regulam a produção de prostaglandinas (PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$) e ciclooxigenase-2 (COX2) nas BOEC. Entretanto, existem diversos outros genes e vias de sinalização nas BOEC, que poderiam sofrer influência da ligação dos espermatozoides durante a formação do reservatório espermático. Além disto, neste estudo de Kodithuwakku, Miyamoto e Wijayagunawardane (2007), foi utilizado um modelo de cultivo das BOEC em monocamadas, o qual conhecidamente causa efeito deletério do sistema de cultivo sobre as características destas células (FERRAZ et al., 2017). Dentre esses efeitos estão a perda de receptores, alterações no padrão de secreção e diminuição ou ausência total do número de cílios (SCHOEN et al., 2008). Desta forma, o cultivo das células da tuba uterina em monocamada pode não refletir a manutenção das características *in vivo* das mesmas.

Diante disso, outras formas de cultivo *in vitro* das BOEC podem ser utilizados para estudar a interação dos espermatozoides e as células da tuba uterina, tais como cultivo de agregados celulares (SUAREZ et al., 1991) e cultivo em 3D (FERRAZ et al., 2017). Dentre estes, os estudos utilizando agregados celulares, também chamados de *explantes,* se apresenta como uma boa alternativa, uma vez que este tipo de cultivo pode ser realizado em um curto período de tempo (SUAREZ et al., 1991), minimizando os efeitos deletérios do sistema de cultivo sobre as características destas células (FERRAZ et al., 2017). De fato, o cultivo em agregados de BOEC garante a manutenção das propriedades destas células semelhantes ao do epitélio original, especialmente de sua morfologia e atividade ciliar intensiva (LEFEBVRE et al., 1995; SARAF et al., 2017).

Entretanto, até o presente momento, o cultivo de agregados de células epiteliais da tuba uterina tem sido utilizado para avaliação da capacidade de ligação dos espermatozoides à estas células (ALDARMAHI et al., 2012; CARVALHO et al., 2018; DE PAUW et al., 2002; LEFEBVRE et al., 1995; LEFEBVRE; LO; SUAREZ, 1997), não sendo relatado nenhum estudo que avalia a capacidade dos espermatozoides de induzir modificações no transcriptoma das BOEC, utilizando este modelo de cultivo. Diante disso, o objetivo do presente trabalho é avaliar diferentes concentrações e tempo de co-incubação com espermatozoides, necessários para promover modificações na transcrição gênica destas células.

2. HIPÓTESE

A ligação dos espermatozoides bovinos às BOEC desencadeia uma via de transcrição gênica, levando à modulação da expressão gênica das BOEC.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito da ligação dos espermatozoides bovinos na transcrição de genes, utilizando um modelo de cultivo de agregados celulares de BOEC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar o nível de transcritos de BOEC co-incubadas com duas concentrações de espermatozoides.
2. Avaliar se o cultivo *in vitro* das BOEC modifica a expressão de genes nestas células.
3. Avaliar o nível de transcritos das BOEC de acordo com o tempo de co-incubação com os espermatozoides.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Anatomia e fisiologia da tuba uterina

Anatomicamente, a tuba uterina se comunica com o útero através da junção útero-tubárica, sendo dividida em três segmentos: istmo, ampola e infundíbulo. Possui estrutura cilíndrica constituída por musculatura longitudinal e circular (YANIZ et al., 2000), cercada por camadas longitudinais internas e externas (WROBEL; KUJAT; FEHLE, 1993), as quais, dependendo da região anatômica podem variar de tamanho. O istmo possui a camada muscular mais desenvolvida e lúmen estreito, quando comparado à região da ampola, a qual possui inúmeras dobras longitudinais adjacente a uma fina camada de músculo liso (FERRAZ et al., 2017). O lúmen estreito do istmo, com poucas vilosidades, favorece o íntimo contato dos espermatozoides com o epitélio tubárico (SUAREZ; WU, 2016).

O epitélio é formado por células epiteliais secretoras e ciliadas, as quais proporcionam ambiente favorável para o processo de transporte e manutenção da viabilidade dos gametas, fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios do embrião (YANIZ; LOPEZ-GATIUS; HUNTER, 2006). A proporção e distribuição destas células pela tuba uterina pode variar de acordo com seu segmento e níveis hormonais de estradiol e progesterona, em especial na região da ampola (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001).

Durante a fase folicular, em que os níveis de estradiol são mais elevados, há maior proporção de células ciliares no infundíbulo e ampola, enquanto que na fase lútea, com altos níveis de progesterona, ocorre maior proporção de células secretoras (YANIZ et al., 2000). Já no istmo, a proporção de células secretoras e ciliadas permanece similar entre a fase folicular e lútea (ABE, 1996). Assim como a proporção de células ciliadas e secretoras pode ser alterada pala fase do ciclo estral, a composição do fluido tubárico também pode ser modificada de acordo com os níveis de estradiol e progesterona circulante (COY et al., 2010).

As células ciliadas são importantes para interação e transporte dos espermatozoides, participando da formação dos reservatórios espermáticos e captação do ovócito (SUAREZ, 2004). Já a secreção das células secretoras é

responsável pela produção do fluido da tuba uterina, formado por secreções celulares específicas e transudado de sangue (LAMY et al., 2016).

O transporte dos espermatozoides é auxiliado pelo batimento ciliar e contração da musculatura lisa da tuba uterina, a qual apresenta movimentos antiperistálticos. Essa contração ocorre devido a ação do estradiol (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001), aumentando gradualmente à medida que aumenta os níveis deste hormônio próximo ao estro, provocando contrações mais fortes e quase contínuas no istmo (CERNY et al., 2015).

Já durante a fase lútea, as contrações tubáricas passam a ter um padrão de motilidade de baixa amplitude e frequência, e um padrão de movimento de ondas peristálticas segmentadas, garantindo o transporte lento do embrião até o útero (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001).

4.2 Interação entre a tuba uterina e espermatozoides

Durante a passagem dos espermatozoides pelo trato reprodutivo da fêmea, ocorre um processo de seleção natural dos mesmos, permitindo que apenas uma pequena fração de espermatozoides chegue ao local de fecundação. Esta seleção se inicia na cérvix, a qual produz o muco cervical, que recobre toda sua superfície, e auxilia no controle da migração dos espermatozoides até o útero (DRUART, 2012).

Este muco é formado por um composto de glicoproteínas glicosiladas, conhecidas como mucinas, as quais são secretadas pelo epitélio cervical em maior quantidade durante o estro, devido a ação do estradiol (GIPSON, 2001). Esta interação bioquímica com o muco cervical envolve glicoproteínas presentes na membrana plasmática do espermatozoide, que facilita a penetração do mesmo pelo muco cervical (YUDIN et al., 2005). Além dessa seleção inicial, na cérvix também ocorre a separação dos espermatozoides do plasma seminal (HUNTER; GADEA 2014).

Após a passagem pela cérvix, os espermatozoides chegam ao útero, o qual pode ser considerado um ambiente desfavorável para a sobrevivência espermática (DENISON et al., 1999). A chegada dos espermatozoides estimula a quimiotaxia de células inflamatórias, com rápido influxo de polimorfonucleares para o lúmen uterino (ALOE et al., 2012). Esta resposta inflamatória transitória auxilia na seleção

espermática, impedindo que espermatozoides capacitados, defeituosos ou mortos continuem sua progressão pelo útero (HOLT; FAZELI, 2016).

Para promover a proteção dos espermatozoides ao ambiente uterino, diversas proteínas secretadas pelas glândulas anexas durante a formação do plasma seminal, são inseridas na membrana plasmática dos espermatozoides no momento da ejaculação. Estas proteínas também inibem a capacitação espermática prematura, aumentando a longevidade dos espermatozoides (GADELLA; LUNA, 2014). Após passarem pelo útero, os espermatozoides chegam à junção útero-tubárica, a qual serve como mais uma barreira de seleção espermática. A junção útero-tubárica é conhecida por ser estreita e possuir uma microarquitetura das paredes que guia os espermatozoides em direção a tuba uterina (SUAREZ; WU, 2016).

Na junção útero-tubárica, proteínas como o complexo de fertilina ADAM1b/ADAM2, presentes no espermatozoide, interagem diretamente com o trato reprodutivo da fêmea, permitindo a passagem dos espermatozoides para a tuba uterina (OKABE et al., 2015). Durante essa passagem, a concentração de espermatozoides em suspensão é reduzida de milhões presentes no útero, para casa dos milhares que conseguem passar pela junção útero-tubárica (HUNTER; GADEA, 2014; SUAREZ; BROCKMAN; LEFEBVRE, 1997). Ao entrarem na tuba uterina, os espermatozoides iniciam um processo de colonização desta região, formando o reservatório espermático. Para formação deste reservatório, apenas espermatozoides morfologicamente normais, não capacitados e com DNA intacto são capazes de se ligar ao epitélio da tuba uterina (BIANCHI et al., 2004; GARCÍA-VÁZQUEZ et al., 2016; LÓPEZ-ÚBEDA et al., 2017). Enquanto os espermatozoides estão ligados às BOEC, sua viabilidade é prolongada, com supressão da capacitação e diminuição de sua motilidade (MILLER, 2015).

A formação do reservatório espermático ocorre no final da fase folicular do ciclo estral, em paralelo com altas concentrações de estradiol e baixas concentrações de progesterona no plasma circulante (YANIZ et al., 2014). Para formação deste reservatório, os espermatozoides se ligam as células ciliadas da região do istmo. Esta ligação ocorre através da interação de receptores e açucares presentes na membrana plasmática dos espermatozoides e as células ciliadas. Inicialmente ocorre o reconhecimento da fucose pelos espermatozoides, a qual está associada à proteína anexina (ANXA 1, 2, 4 e 5), presentes nas BOEC (DEFAUS et al., 2016; RIJSSELAERE et al., 2014). As anexinas são uma família de proteínas intracelulares

que exibem ligação dependente de Ca^{2+} aos fosfolipídios de membrana. O Ca^{2+} é responsável pela principal propriedade bioquímica de qualquer molécula de anexina, isto é, capacidade de associar-se intimamente à membrana plasmática celular (RAYNAL; POLLARD, 1994).

As concentrações livres de Ca^{2+} necessárias para iniciar a ligação de fosfolipídios diferem acentuadamente entre as diferentes anexinas. Eles variam de 20 µM a 100 nM (RAYNAL; POLLARD, 1994). Isso indica que as anexinas podem responder a um amplo espectro de alterações de Ca^{2+} com a translocação do citoplasma para a membrana (GERK; CREUTZ; MOSS, 2005).

Entre as proteínas envolvidas na ligação dos espermatozoides e anexinas, a PDC109, também chamada de BSPA1/A2, é uma das mais conhecidas, estando presente no plasma seminal e incorporada na membrana plasmática dos espermatozoides no momento da ejaculação (GWATHMEY; IGNOTZ; SUAREZ, 2003; IGNOTZ et al., 2001). No plasma seminal, a presença da proteína PDC109, garante que os espermatozoides não se liguem a nenhuma molécula fucolisada no local de deposição de sêmen, antes de chegarem à tuba uterina (SUAREZ, 2002). Já nos espermatozoides, esta proteína remove uma quantidade significativa de colesterol da membrana plasmática, protegendo e garantindo maior estabilização dessa membrana, e consequentemente auxiliando na prevenção da capacitação e reação acrossomal prematura (SRIVASTAVA et al., 2013).

Após a formação dos reservatórios, os espermatozoides permanecem ligados à tuba uterina até o momento próximo a ovulação. Neste momento, os espermatozoides começam uma progressiva e contínua liberação das BOEC (FAZELI et al., 1999), que ocorre simultaneamente à capacitação espermática. Uma variedade de substâncias presentes no fluido da tuba uterina são consideradas agentes de capacitação espermática, incluindo bicarbonato (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007), glicosaminoglicanos (BERGQVIST; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006), Ca^{2+} (VISCONTI et al., 2002) e norepinefrina (WAY; KILLIAN, 2002). Durante o processo de capacitação, ocorrem uma série de mudanças no espermatozoide, tanto na cabeça como na cauda, preparando os mesmos para passar pela reação acrossômica (ALVAU et al., 2016; BATTISTONE et al., 2013).

Embora não seja definido qual o mecanismo está envolvido na liberação dos espermatozoides, há diferentes hipóteses para explicar este mecanismo, que incluem contrações do músculo liso da tuba uterina (CHANG; SUAREZ, 2012), pH,

temperatura (HUNTER et al., 2009), fatores quimiostáticos liberados pelo ovócito após a ovulação (MILLER, 2015) e a presença de progesterona (BRÜSSOW; RATKY; RODRIGUEZ-MARTINEZ; 2008). Há evidências que demostram que após a ovulação, o aumento gradativo de progesterona pode ativar a liberação localizada de espermatozoides da região do istmo (BRÜSSOW; RATKY; RODRIGUEZ-MARTINEZ; 2008).

Uma perda dos sítios de ligação no epitélio da tuba uterina ou a perda de proteínas ligadas à membrana plasmática do espermatozoide podem também estar relacionadas à sua liberação do reservatório (IGNOTZ et al., 2001). Acredita-se que o desencadeador deste processo, seja o aumento dos canais intracelulares de Ca^{2+} na membrana plasmática dos espermatozoides (HO; WOLFF; SUAREZ, 2009; KIRICHOK; NAVARRO; CLAPHAM, 2006). A liberação de colesterol e a redistribuição de proteínas na membrana plasmática permitem a abertura dos canais de Ca^{2+} e, consequentemente, o aumento dos níveis de cálcio intracelular (SOUZA et al., 2014). Ao se desligarem da tuba uterina, pequenas sub-populações de espermatozoides mudam seu padrão de motilidade, e rapidamente atingem um estado hiperativado (HO; WOLFF; SUAREZ, 2009).

Além disto, a heparina, um glicosaminoglicano, também pode estar envolvida no processo de liberação destes espermatozoides de seu reservatório. A maioria das propriedades funcionais das anexinas é atribuída à sua capacidade de se ligarem a fosfolipídios da membrana e a certos outros polímeros aniônicos, incluindo glicosaminoglicanos como a heparina e o sulfato de heparano, de maneira dependente de Ca^{2+} (SHAO et al., 2006). Na ausência de Ca^{2+}, a heparina ou um glicosaminoglicano semelhante, proporciona a separação da molécula de fucose de proteínas de membrana dos espermatozoides (SUAREZ et al., 2002).

4.3 Efeito dos espermatozoides sobre a tuba uterina

Está claro que a tuba uterina exerce importante função na manutenção da viabilidade dos gametas e desenvolvimento de embriões em estágios iniciais (RIZOS et al, 2002). Isto ocorre através do ambiente tubárico, que é mantido por secreções das células epiteliais da tuba uterina (CURTIS et al., 2012). Embora este efeito da tuba uterina sobre os espermatozoides seja bem elucidado, ainda não está claro se a

ligação dos espermatozoides às células epiteliais da tuba uterina pode induzir mudanças nas mesmas.

Alguns estudos demostram que o ambiente da tuba uterina pode ser modulado pela presença dos gametas (LEE et al., 2017) ou embrião (CEBRIAN-SERRANO et al., 2013; SCHMALTZ-PANNEAU et al., 2014) em estágio inicial de desenvolvimento. De fato, o co-cultivo *in vitro* de embriões com BOEC durante os quatro primeiros dias do desenvolvimento, é suficiente para acelerar a cinética de desenvolvimento nos dias 6 e 7 de cultivo. Além disto, a presença destas células no cultivo de embriões, pode induzir mudanças no perfil de expressão de genes de qualidade embrionária nestes embriões (CORDOVA et al., 2014).

Em relação à modulação da tuba uterina mediada por espermatozoides, foi demonstrado pela primeira vez por Fazelli et al., (2004) em camundongos, que a ligação dos espermatozoides às células da tuba uterina, desencadeia uma via de transdução de sinais, levando à modulação da expressão gênica nas BOEC nos genes ADM e PTGS2. Posteriormente, Georgiou et al., (2005) demonstraram que o perfil proteômico secretor da tuba uterina também pode ser modificado pela presença dos espermatozoides, assim como pela presença de ovócitos e embrião (ARTEMENKO et al, 2015; GEORGIOU et al., 2007; YESTE et al., 2014).

Outros estudos em suínos avaliaram a expressão de genes das células epiteliais da tuba uterina após 24h da inseminação artificial (IA), confirmando que essa ligação influencia a transcrição de genes dessas células. Georgiou et al., (2007) utilizando análises de PCR em tempo real e Western blot, demostraram a aparente correlação entre transcrição dos genes C3, RBP e OGP e expressão de suas proteínas em tuba uterina de suínos, reforçando as evidências sobre a modulação do ambiente da tuba uterina em resposta aos espermatozoides. Isto provavelmente modifica a composição do fluido tubárico, promovendo a formação de um ambiente propício para a manutenção da viabilidade espermática e fecundação (MILLER, 2015).

Além disto, Almiñana et al., (2014), mostraram que a presença de espermatozoides portadores de cromossomos X e Y, induziram diferentes respostas transcriptômicas dentro da tuba uterina. Este resultado sugere que as células da tuba uterina também podem detectar diferenças sutis entre os espermatozoides, como a presença de cromossomo X ou Y, e assim influenciar o sexo dos descendentes, assim como alterar sua fisiologia em resposta a essa modulação transcricional.

Embora haja evidências de que a presença dos espermatozoides realmente pode modular a função das BOEC, não se sabe exatamente quanto tempo após a formação dos reservatórios tem início estas modificações. Em estudo realizado em coelhos, foi identificado que os espermatozoides desencadearam mudanças no proteôma da superfície celular epitelial da tuba uterina, e que essas alterações podem ter início a partir de 1h após a interação com os espermatozoides (ARTEMENKO et al., 2015). Entretanto, como o tempo de permanência dos espermatozoides ligados as BOEC pode ser variado de acordo com a espécie, não se sabe exatamente quanto tempo é necessário para que esta modificação seja induzida nas diferentes especeis domesticas.

A necessidade de uma ligação correta dos espermatozoides às células da tuba uterina vem sendo comprovada em estudos *in vitro*. A identidade das moléculas que participam da ligação espermática à tuba uterina é altamente específica, sendo que diferentes espécies podem ter diferentes moléculas relacionadas a formação dos reservatórios (KADIRVEL et al., 2012). Machado et al., (2014), mostraram em suínos, que a ligação dos espermatozoides a esferas de agarose revestidas com glicano, requer estruturas específicas de glicano, e comprova que os espermatozoides são capazes de identificar de maneira muito precisa os receptores de superfície celular. Este estudo ainda demostra que esses receptores se ligam à cabeça do espermatozoide e que essa ligação, é reduzida após a capacitação.

Em bovinos, um sistema de co-cultivo de BOEC em monocamadas com espermatozoides, indicaram que apenas espermatozoides móveis aumentaram a secreção de prostaglandinas pelas BOEC, sendo que espermatozoides mortos não estimularam a expressão de RNAm e a secreção de prostaglandinas (KODITHUWAKKU; MIYAMOTO; WIJAYAGUNAWARDANE, 2007).

4.4 Cultivo *in vitro* de células epiteliais da tuba uterina

Nos últimos anos, um número crescente de estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a fisiologia da tuba uterina, tem demonstrado que existe uma via bidirecional de comunicação entre os gametas, embriões e a tuba uterina (CARVALHO et al., 2018; LÓPEZ-ÚBEDA et al., 2017; SUAREZ, 2016; SUAREZ; WU, 2016). Para este fim, o mais importante pré-requisito quando se utiliza um estudo *in vitro*, com cultivo de

células epiteliais da tuba uterina, é que a fisiologia destas células seja mantida ao longo do cultivo. Para os estudos *in vitro*, diferentes metodologias de cultivo podem ser utilizadas, tais como modelos 2-D em monocamadas (FERRAZ et al., 2016), em 3-D como agregados celulares (NELIS et al., 2014) e outras culturas tridimensionais como modelos organóides (KESSLER et al., 2015). Dentre estes, o método mais comumente relatado para investigar a função da tuba uterina é a cultura em monocamada (GUALTIERI et al.,2012, GUALTIERI et al., 2013, JOSHI 1995). Embora a morfologia das células epiteliais da tuba uterina não seja preservada durante a cultura 2-D, vários estudos realizados em monocamadas demonstraram que as interações entre essas células e os espermatozoides poderiam modular suas secreções e influenciar na função espermática (ELLINGTON et al., 1998; MORALES et al., 1996; TALEVE; GUALTIERI, 2010).

A cultura de BOEC em monocamada necessita de alguns dias para seu estabelecimento, ocorrendo um efeito deletério do sistema de cultivo sobre as características das BOEC (FERRAZ et al., 2017). Dentre esses efeitos estão a perda rápida de receptores, polaridade celular, alterações no padrão de secreção e diminuição ou ausência total do número de cílios (GUALTIERI et al., 2012; SCHOEN et al., 2008). Desta forma, o cultivo das células da tuba uterina em monocamada pode não refletir a fisiologia destas células semelhante a fisiologia *in vivo*.

Uma outra alternativa é o cultivo em 3-D, utilizando membrana porosa e interfaces ar-líquido. Esta técnica permite que as células epiteliais da tuba uterina cultivadas retenham suas características de células epiteliais colunares polarizadas, e já foram aplicadas com sucesso em várias espécies de mamíferos, como suínos (CHEN; EINSPANIER; SCHOEN, 2013), humanos (FOTHERINGHAM; LEVANON; DRAPKIN, 2011) e bovinos (REISCHL et al., 1999). Neste sentido, a cultura tridimensional do epitélio da tuba uterina, pode representar um modelo *in vitro* mais confiável para estudos voltados para o entendimento da interação com gametas e embriões a nível molecular.

Outro modelo *in vitro* usado para estudar a interação com gametas, especialmente com os espermatozoides, são os agregados celulares, também chamados de *explants*. Os agregados são formados de células epiteliais e estromais da tuba uterina que se organizam para formar complexos celulares móveis com cílios ativos na superfície externa da célula (NELIS et al., 2014). Usando esse sistema de cultura, as BOEC mantêm sua organização semelhante ao do tecido *in vivo*, as quais

não são possíveis em uma cultura 2-D. Entre as vantagens do cultivo em agregados, está o rápido estabelecimento de seu cultivo, que demora aproximadamente 24h após a coleta destas células (ROTTMAYER et al., 2006). Neste modelo de cultivo, diversas características celulares são mantidas, garantindo a manutenção da atividade ciliar (GUALTIERI, et al., 2013), dos grânulos secretores (ULBRICH et al., 2010) e receptores celulares (MAILLO et al., 2016). Dentre estas características, a atividade ciliar torna-se muito importante, pois os espermatozoides ligam-se preferencialmente aos cílios de células epiteliais ciliadas (POLLARD et al., 1991). Dessa forma o uso de agregados garante a manutenção da atividade ciliar com vigoroso batimento durante todo o período de cultura, semelhante ao que ocorre *in vivo* (ROTTMAYER et al., 2006).

4.5 Genes selecionados

Os processos através dos quais a informação contida nos genes é convertida em moléculas que determinam as propriedades da célula, ou seja, a transferência de informação genética de DNA a proteína, designa-se por expressão gênica (MERKL et al., 2010). A expressão de um gene engloba uma série de fatores, que vão desde a síntese de uma molécula de RNA, a partir de uma sequência de bases na molécula de DNA até a síntese de uma proteína a partir dessa molécula de RNAm (EL-HANI, 2005). Atualmente, a biologia molecular progrediu enormemente, tornando possível analisar mudanças sutis na expressão gênica de uma única célula ou usando quantidades muito pequenas de tecido (MERKL et al., 2010).

Alguns genes podem estar relacionados a interação dos espermatozoides com as BOEC. A maioria desses genes podem ter influência na maturação, viabilidade e função dos gametas, e há evidências que sugerem que esses genes podem preparar o ambiente da tuba uterina para os próximos eventos como capacitação, fecundação e desenvolvimento inicial embrionário (GEOGIOU et al., 2007).

4.5.1 α3-Fucosyltransferase-VI (FUT6)

O FUT6 codifica a enzima a3-fucosiltransferase do "tipo plasma“, responsável por regular a fucosilação, envolvida em vários processos biológicos (RYOO; RYU; LEE, 2015). A fucose é um componente das glicoproteínas, glicolipídeos e oligossacrídeos, comumente ligado a açúcares através dos seus 2, 3, 4 ou 6 hidroxilas (MACHER et al., 1991). Os oligossacárideos fucosilados da superfície celular desempenham um papel na adesão celular mediada por inflamação (WIEDERSCHAIN, et al., 1998).

Este gene também é conhecido por sintetizar o carboidrato sialyl Lewis X, (TANIGUCHI; HONKE; FUKUDA, 2011). De acordo com Kadirvel et al., (2012), os quais analisaram os componentes do istmo de porcas, foi identificado que todos os glicanos que ligavam espermatozoides às células da tuba uterina continham sialyl Lewis X. Posteriormente, Machado et al., (2014), demonstraram, que o sialyl Lewis X participa da ligação dos espermatozoides às células da tuba uterina, participando portanto, da formação do reservatório espermático.

4.5.2 Acetilglucosaminiltransferase 3 (B3GNT3)

O gene B3GNT3 codifica a glicoproteína de membrana GnT-III, que está envolvida na biossíntese de cadeias de açúcar. A atividade da proteína GnT-lll, foi observada pela primeira vez na tuba uterina de galinhas (NARASIMHAN, 1982), tendo função regulatória da biossíntese de oligossacarídeos (TANIGUCHI; HONKE; FUKUDA, 2011) que se ligam a glicanos presentes na superfície das células.

Além disto, o gene B3GNT3 parece participar como regulador da placentação, uma vez que a GnT-III é altamente expressa na superfície do epitélio uterino materno e nas células trofoblásticas durante a implantação do embrião em humanos (DENG et al., 2018).

4.5.3 NAD(P)H: Quinona Oxidoredutase 1 (NQO1)

O NQO1 está localizado principalmente no citoplasma, podendo também ser detectado em níveis mais baixos no núcleo. Nos tecidos humanos, o NQO1 é expresso em níveis elevados em diversas células epiteliais, endotélio e adipócitos (SIEGEL;

ROSS, 2000), atuando como enzima antioxidante, possivelmente pela redução de quinonas, que subsequentemente ajudam a proteger as membranas celulares contra o dano oxidativo (ATIA; ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014). O excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode levar à morte celular via oxidação de lipídeos de membrana, conhecida como peroxidação lipídica, e pela oxidação de proteínas (AMIN et al., 2014).

4.5.4 Creatina Kinase B (CKB)

O gene CKB codifica a enzima creatina kinase B, que catalisa a fosforilação reversível da creatina, (HALLAK et al., 2001). Células que requerem alta energia, como espermatozoides, são caracterizados por alta atividade da creatina quinase (HAN, 2016). A creatina quinase é um marcador de maturidade espermática que se correlaciona com a capacidade de fecundação do espermatozoide humano (HALLAK et al., 2001). O gene CKB também é expresso em nível mais alto em células do cúmulus, e está associado a boa qualidade embrionária em humanos (LEE et al., 2010).

4.5.5 Cistatina 6 (CST6)

O gene CST6 parece desempenhar um papel importante na diferenciação de células epiteliais (VEENA et al., 2008). Além disto, este gene participa na produção de cistatina M ou E/M, um inibidor de proteases de cisteína lisossomal, que atua como protetor das células contra proteólise (TURK; BODE, 1991). Este gene vem sendo relacionado como um marcador genético de alta prolificidade em ovinos, com baixa expressão gênica em tecido ovariano (POKHAREL et al., 2018).

4.5.6 Receptor de ácido Retinóico 2 (RARRES2)

O gene RARRES2 ou também conhecido como CHEMERIN, é uma adipocina envolvida na regulação de adipogênese, metabolismo energético e

inflamação. Dados sugerem que este gene também desempenha um papel na função reprodutiva em ratos e humanos (SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK et al., 2009; NAGPAL et al., 1997; WITTAMER et al., 2003). CHEMERIN é uma proteína altamente específica para o receptor de quimiocina tipo 1 ou ChemR23 e funciona como uma quimiocina que induz a migração de leucócitos e a mobilização do Ca^{2+} intracelular (MONNIER et al., 2012).

RARRES2 é um regulador negativo da esteroidogênese, induzida pelo FSH durante o desenvolvimento o folicular (WANG et al., 2012) e por IGF-1 na proliferação celular no ovário humano. Isto ocorre através da diminuição na ativação das vias de sinalização de receptores de IGF-1 em células da granulosa (REVERCHON et al., 2012).

Reverchon et al. (2014), demonstraram pela primeira vez que o RARRES2 e seus três receptores CMKLR1, GPR1 e CCRL2 estão presentes no folículo ovariano bovino, e que *in vitro*, RARRES2 manteve a maioria dos ovócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Isto sugere que este gene poderia regular não apenas a esteroidogênese nas células da granulosa, mas também a maturação nuclear em ovócitos bovinos durante a maturação. Além disto, foi demonstrado que este gene está mais expresso em células da granulosa de pequenos folículos.

4.5.7 Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF)

O MIF desempenha um papel crucial no processo inflamatório, envolvendo o recrutamento e ativação celular, fagocitose e síntese de citocinas pró inflamatórias (LOPES et al., 2011). Estas citocinas desencadeiam respostas inflamatórias e a proliferação celular, regulando positivamente o crescimento celular e apoptose (BIFULCO et al., 2008).

A expressão gênica e proteica do MIF foi relatada na tuba uterina em camundongos (SUZUKI; KANAGAWA; NISHIHIRA, 1996) e humanos (WADA et al., 1997), sendo que sua proteína está presente no fluido folicular e nas células da granulosa, assim como no corpo lúteo de bovino (BOVE et al., 2000). Altos níveis de estradiol durante o estro podem regular negativamente a expressão de MIF na tuba uterina bovina (NAHAR; KADOKAWA, 2017). Estes autores demonstraram que a mesma esta aumentada durante o período pós-ovulatório.

Este gene também está relacionado com a regulação da glicose. É conhecido que a glicose excessiva pode ser prejudicial para a maturação de ovócitos bovinos e o desenvolvimento de embriões em estágio inicial (KUMAR et al., 2012). A resistência à insulina associada ao alto índice de escore corporal, podem causar menor expressão do MIF. Com isto, sua expressão na tuba uterina pode ser regulada negativamente para proteger o embrião (NAHAR; KADOKAWA 2016).

4.5.8 FOS

O Gene FOS corresponde a proteínas nucleares, que parecem regular os eventos necessários para a transição G0-G1 e o ciclo celular (DELIDOW; WHITE; PELUSO, 1990). Os produtos proteicos de FOS e JUN foram associados ao sítio de ligação da proteína ativadora do fator de transcrição-1 (AP-1) que regula a transcrição de muitos genes alvo (RAUSCHER et al., 1988). Sua transcrição é comumente ativada em resposta a ligantes exógenos, e age regulando a proliferação, diferenciação e apoptose celular de maneira específica (HESS; ANGEL; SCHORPP-KISTNER, 2004; MAZUR et al., 2015).

A expressão de FOS tem sido associada com proliferação e desenvolvimento celular (DELIDOW; WHITE; PELUSO, 1990), como no desenvolvimento folicular antes do pico de LH, o qual envolve extensa proliferação celular para crescimento do folículo.

Este gene responde positivamente ao FSH, aumentando rapidamente sua expressão (DELIDOW et al., 1992). Em vacas, na resposta a superestimulação folicular, o FOS foi classificado como marcador da fase de crescimento folicular (DIAS et al., 2013). Em roedores, a expressão de FOS diminui com a luteinização (RUSOVICI; LAVOIE, 2003), além de aumentar o nível de RNAm por ação estrogênica, sendo relacionado à proliferação de células epiteliais uterinas (BOETTGER-TONG; MURTHY; STANCEL, 1995; LI et al., 2003; YOSHIDA; NEWBOLD; DIXON, 2000).

Os transcritos de FOS são observados nos ovócitos em estágio de vesículas germinativa e de meiose II na espécie bovina, sugerindo que o RNAm de FOS materno pode desempenhar um papel no desenvolvimento embrionário inicial (JIN; O'NEILL,

2011; REGASSA et al., 2011). Além disto, no quinto dia de gestação de roedores e coelhos, durante a implantação do embrião, foi relatado que a expressão de FOS no útero é positivamente modulada pelo estrógeno e progesterona (KIRKLAND; MURTHY; STANCEL 1992; LIU et al., 2016).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e processamento das células da tuba uterina

Todas as coletas foram realizadas em abatedouros da região de Luziânia, Cidade Ocidental e Formosa. O experimento foi realizado no laboratório de reprodução animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo comitê de ética de uso animal (CEUA) da ESALQ (Protocolo no. 2013-25). Os agregados celulares foram coletados e processados de acordo com De Pauw et al. (2002) e Kadirvel et al. (2012), com modificações. Complexos de tuba uterina e ovário de vacas Nelore foram coletados em abatedouro e transportados ao laboratório até 4h pós coleta. Durante o transporte, os tratos reprodutivos foram mantidos em solução salina (NaCl 0,9%) aquecida à 35 ºC, suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (50 µg/mL). No laboratório, as tubas uterinas foram separadas e dissecadas de tecidos adjacentes, sendo utilizadas apenas tubas uterinas provenientes de trato reprodutivo cujo ambos os ovários apresentavam ausência de CL. Para cada dia de manipulação, foram selecionadas de 8 a 10 tubas uterinas, utilizando apenas uma tuba uterina de cada trato reprodutivo, sendo selecionada a tuba uterina ipsilateral ao ovário que apresentava maior folículo. Após dissecação das tubas uterinas (Figura 1), a região do istmo foi separada, considerando até 4 cm a partir da junção útero-tubárica. Cada segmento dissecado foi imerso em 1 mL de meio TALP (TCM-199 com sais de Hank´s, Gibco BRL®, suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB, Gibco BRL® e amicacina a 100 UI/mL).

Figura1: Dissecação da tuba uterina bovina proveniente de trato reprodutivo coletado em abatedouro (arquivo pessoal).

Após a dissecação, as BOEC foram coletadas em placa de petri, com auxílio de uma lâmina de vidro, sendo realizada pressão contínua sobre o segmento do istmo dissecado para a retirada das células. As células recuperadas foram transferidas para tubo cônico de 15 mL, lavadas duas vezes em 5 mL de meio TALP, com remoção do sobrenadante após sedimentação por gravidade durante 5 min em estufa de cultivo a 38,5 ºC e 5% de CO_2 em ar. Entre as lavagens, as células foram desagregadas por sucessivas pipetagens com pipeta de 1000 µL (primeira lavagem) e escalpe de 19 gauge acoplado a uma seringa de 10 mL (segunda lavagem).

As células desagregadas foram transferidas para placa de petri de 100 mm com volume final de 25 mL de meio TALP, e mantidas em cultivo por aproximadamente 24 h a 38,5 ºC e 5% de CO_2 em ar para formação de agregados celulares. Entre 6 a 8 h após o início do cultivo, foi realizada troca parcial do meio de cultivo. Após 24 h de cultivo, os agregados foram selecionados em esteriomicroscópio e distribuídos em gotas de 50 µL de fluido sintético do oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos, citrato, inositol e 5% de SFB (HOLM et al., 1999), e cobertas com óleo mineral (Sigma).

5.2 Seleção, concentração espermática e inseminação.

Após seleção dos agregados, os mesmos foram co-incubados com espermatozoides provenientes de sêmen congelado de seis touros Nelore (Figura 2).

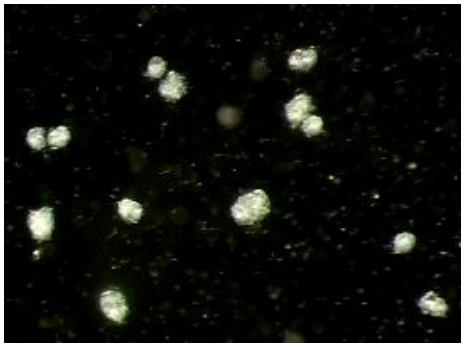

Figura 2: Fotografia de contraste em esteriomicroscópio, faixa de zoom de 3x, de agregados celulares proveniente de células da tuba uterina incubados com espermatozoides (arquivo pessoal).

O sêmen de cada touro foi descongelado em banho-maria a 37 ºC por 30 segundos, sendo agrupados em um pool. Para separação dos espermatozoides mortos e retirada do meio de congelamento, o pool de espermatozoides foi submetido a um gradiente descontínuo de Percoll, conforme descrito por Machado et al. (2009).

Resumidamente, o gradiente de Percoll foi constituído de 400 µL de Percoll 45% e 400 µL de Percoll 90%, e centrifugadas a 9000 rpm por 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado por 5 min em meio SP-TALP. O pellet resultante foi ressuspendido com SP-TALP, com posterior contagem dos espermatozoides em hemocitômetro para determinação da concentração espermática.

As gotas contendo os agregados foram inseminadas com diferentes concentrações espermáticas e mantidas em cultivo por diferentes tempos de co-incubação. Como controle foram coletados agregados no momento 0h sem que tenha ocorrido contato com os espermatozoides (figura 3). Em todos os grupos, 5 a 7 agregados foram selecionados aleatoriamente e guardados em microtubos com RNA later, identificados e mantidos em freezer -80ºC. As amostras foram coletadas de forma simultânea para os dois experimentos e posteriormente nas análises, foram realizadas as divisões em experimento 1 e 2.

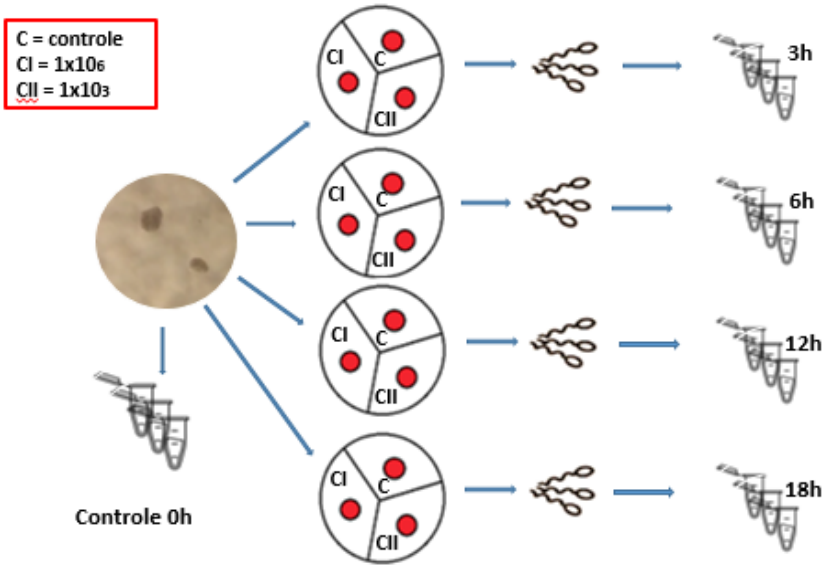

Figura 3: Esquema demonstrando o delineamento experimental dos experimentos I e II. Agregados de BOEC foram incubados com espermatozoides na concentração de $1x10^6$ espermatozoides/mL (CI) e na concentração de $1x10^3$ espermatozoides/mL (CII), além da gota controle (C) apenas com agregados celulares. No momento 0h sem incubação, 3 amostras de agregados foram coletadas e guardadas em freezer -80ºC. Posteriormente ao respectivo tempo de co-incubação (3, 6, 12 ou 18h, nas placas de cultivo de agregados celulares com espermatozoides), as amostras foram coletadas da mesma forma em micro tubos para posterior análise de PCR em tempo real (o autor).

5.3 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Após cada período de co-incubação entre os agregados de BOEC e espermatozoides, um pool de 5 a 7 agregados foram lavados em meio tampão fosfato (PBS), e armazenados em RNA later em freezer à -80ºC. Para cada grupo experimental, o RNA total foi extraído do pool de agregados, utilizando o Kit PicoPure® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA – Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, as amostras foram tratadas com DNase PureLink (Invitrogen, Promega, Waltham, MA, EUA – Thermo Fisher) em coluna, de acordo com as instruções do fabricante. O total de RNA tratado foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o Kit GoScript™ Reverse Transcription System, de acordo com instruções do fabricante, obtendo-se 30 µL de cDNA para cada amostra.

As reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas usando o kit GoTaq® qPCR Master Mix. As reações foram preparadas com volume final de 25 µL, sendo realizadas em triplicata técnica, e utilizando o equivalente a 1 µL do cDNA por reação. As condições para amplificação dos genes foram de 95 ºC durante 5 min seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 ºC durante 10 segundos, com posterior anelamento e extensão à 60 ºC durante 30 segundos.

As análises de RT-qPCR foram realizadas utilizando 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). As sequências dos primers, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento estão listados na tabela 1. As reações foram realizadas com eficiência de amplificação entre 90 e 120%. Os valores dos genes alvo foram normalizados pela expressão dos genes constitutivos Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β-actin (ACTB), e peptidylprolyl isomerase A (PPIA). Os níveis de expressão dos três genes constitutivos foram submetidos ao software GeNorm, o qual indicou o gene GAPDH como sendo o mais estável para as condições deste estudo. A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método ΔΔCt, com correção da eficiência de Pffall (PFAFFL, 2006).

Tabela 1. Identificação do gene, sequência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb), concentração dos iniciadores, eficiência dos iniciadores e número de acesso ao Genbank.

Genes	Sequência dos iniciadores	Tamanho do amplicon (bp)	Concentração do iniciador (nM)	Eficiência (%)	GeneBank Número de acesso/referência
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118	300	94,54	NM_001034034.2
FUT6	F: GAC TCT ATC AGG GTG CAA TAC R: CAG CTT CTC TGT GAT GTA GTC	174	300	108,021	NM_176851.1
NQO1	F: CCA CGA GGA ATG AAT AGT AGA G R: CTG TCT GGC ATC TTT CTA CC	167	300	110,069	NM_001034535.1
FOS	F: CGC ATT ACA GAG AGG AGA AAC R: CAT CTC CAG AAG AGG TAA GGA	155	300	99,321	NM_182786.2
B3GNT3	F: GGC TAC TAT CTC CAT CCC TAT R: GAA GGA TGT GTA GGA GTT CAC	147	300	118,068	NM_001098473.1
CKB	F: GCA TCT GGC ATA ACG ACA AT R: TGA AGA GCG TTT CAA TCT GG	147	300	102,00	NM_001015613.1
RARRES2	F: GGA AGA AAG ACTG GAG GAA AG R: GTT GAA CCT GAG TCT GTA TGG	141	300	97,69	NM_001046020.2
MIF	F: CAC AGC ATCG GCA AGA T R: TGT CGC AGA AGT TGA TGT AG	118	300	100,504	NM_001033608.1
CST6	F: CGT GGC CAA CTA CAA CAT R: CAG CCA CAG CAC TCT TC	149	300	102,946	NM_001012764.3

F: *primer forward;* R: *primer reverse*

5.4 Delineamento experimental

Os genes foram selecionados com base no trabalho de Carvalho (2010), (dados não publicados) que utilizou animais da raça nelore sincronizados e inseminados com os respectivos grupos: 1) Controle: inseminados com placebo. 2) Inseminação com sêmen convencional. 3) inseminação com sêmen sexado. Após 18h da inseminação os animais foram abatidos, e as tubas uterinas foram coletadas e levadas ao laboratório para coleta das BOEC. As amostras foram encaminhadas para sequenciamento de RNA (RNAseq). Com base nas análises do trabalho citado acima, para a seleção dos genes do presente estudo, foram selecionados 8 genes utilizados neste experimento.

5.4.1 Experimento 1: Nível de transcritos das BOEC de acordo com a concentração espermática.

Este experimento teve o objetivo de avaliar o nível de transcritos de BOEC co-incubadas com duas diferentes concentrações de espermatozoides. Além disto, foi avaliado se o cultivo *in vitro* das BOEC poderia modificar sua expressão gênica. Para isto, as gotas de cultivo contendo os agregados foram divididas em quatro grupos, sendo: a) Controle 0h (CTR 0h): agregados coletados no momento em que foram colocados em cultivo; b) controle 18h (CTR 18h): agregados mantidos em cultivo por 18h sem espermatozoide; c) Espermatozoides 10^3 (Sptz 10^3): agregados co-incubados por 18h com concentração de espermatozoides de $1x10^3$/mL; d) Espermatozoides 10^6 (Sptz 10^6): agregados co-incubados por 18h com concentração de espermatozoides de $1x10^6$/mL. Para cada grupo foi utilizado 3 gotas de cultivo contendo de 21 a 25 agregados. Após o período de co-incubação, 5 a 7 agregados de cada grupo/gota foram coletados aleatoriamente e armazenados em microtutubo de 0,2 mL contendo RNA later e mantidos em freezer -80 ºC até o momento de uso. Todo o procedimento de cultivo, incubação e coleta foram realizados em 5 repetições distintas.

Como controle negativo neste experimento, no momento da extração de RNA, foi realizada extração de RNA do mesmo pool de espermatozoides utilizados na co-incubação com os agregados celulares. Considerando o número de agregados utilizados e de espermatozoides ligados por mm de agregado (CARVALHO et al., 2018), foi realizada extração de RNA de aproximadamente 200 espermatozoides por réplica. Para seleção espermática e contagem do número de espermatozoides, foram utilizados os procedimentos descritos anteriormente.

5.4.2 Experimento 2 – Nível de transcritos das BOEC de acordo com o tempo de co-incubação com os espermatozoides.

Com base no experimento anterior, a concentração de $1x10^6$ espermatozoides/mL, foi escolhida para avaliar se o tempo de co-incubação influenciaria no nível de transcritos das BOEC para os genes selecionados. Para isto, as gotas de cultivo contendo os agregados foram divididas em 4 grupos, sendo: a)

Controle 0h (0h): agregados coletados no momento em que foram colocados em cultivo; b) Espermatozoide 3h (3h): agregados incubados por 3h com concentração de espermatozoides de $1x10^6$/mL; c) Espermatozoide 6h (6h): agregados incubados por 6h com concentração de espermatozoides de $1x10^6$/mL d) Espermatozoide 12h (12h): agregados incubados por 12h com concentração de espermatozoides de $1x10^6$/mL. A distribuição do número de agregados por gota e forma de armazenamento foram realizadas conforme descrito anteriormente.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito da presença dos espermatozoides sobre o nível de transcritos das BOEC foi testado por análise de variância (ANOVA). Todos os dados apresentaram distribuição normal e as diferenças entre as médias foram comparados pelo teste de Tukey, considerando nível de significância de $P<0,05$. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão (DP). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

7. RESULTADOS

Experimento 1 – Nível de transcritos das BOEC de acordo com a concentração espermática.

A abundancia relativa de transcritos dos genes avaliados nas BOEC expostas a duas diferentes concentrações de espermatozoides durante 18h de co-incubação estão apresentados na figura 4.

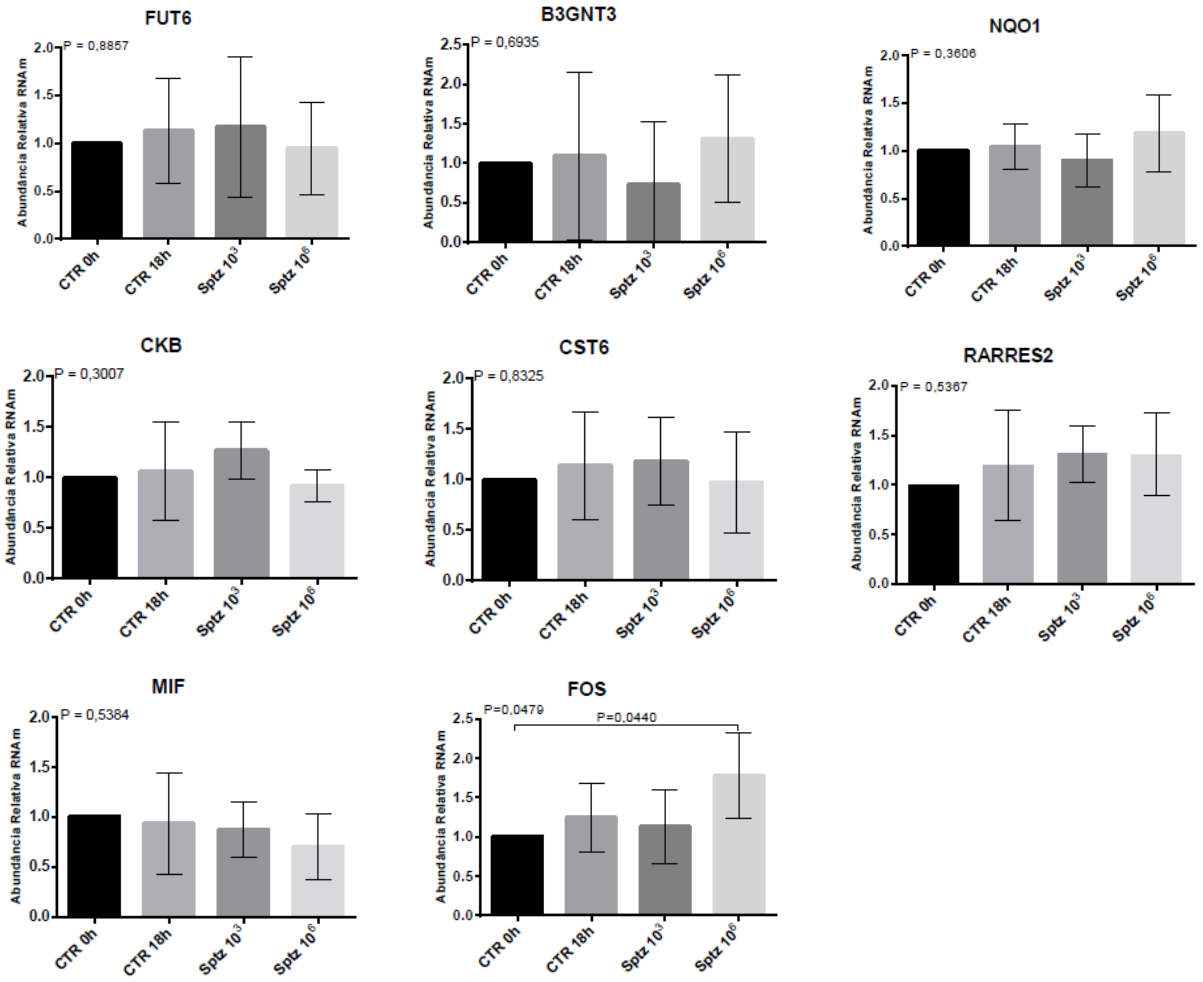

Figura 4: Níveis de abundância relativa (média ± desvio padrão) de RNAm dos genes FUT6, B3GNT3, NQ01, CKB, CST6, RARES 2, MIF e FOS em BOEC co-incubadas com duas diferentes concentrações espermáticas durante 18h e obtidos a partir de 5 réplicas biológicas. Os tratamentos incluem: a) Controle 0h (CTR 0h) b) Controle 18h (CTR 18h); c) co-incubação das BOEC com $1x10^3$/mL espermatozoides por 18 h (Sptz 10^3); d) co-incubação das BOEC com $1x10^6$/mL espermatozoides por 18h (Sptz 10^6).

Ao se comparar os grupos controle 0 e 18h, não foi observada efeito do tempo de cultivo na expressão dos genes avaliados. Para a concentração de $1x10^3$ espermatozoides, o nível de transcritos dos genes avaliados se manteve constante em relação ao grupo controle 0h. Quando os agregados foram incubados por 18h com concentração de $1x10^6$ espermatozoides, o gene FOS apresentou aumento de sua expressão (P=0,044) após co-incubação. Em relação ao nível de transcritos nas amostras em que foram utilizadas apenas espermatozoides todos os genes avaliados apresentaram nível de expressão indeterminado.

Experimento 2 – Nível de transcritos das BOEC de acordo com o tempo de co-incubação com os espermatozoides

A abundância relativa de transcritos dos genes avaliados nas BOEC expostas a diferentes tempos de incubação com espermatozoides na concentração de $1x10^6$ espermatozoides/mL, estão apresentados na figura 5.

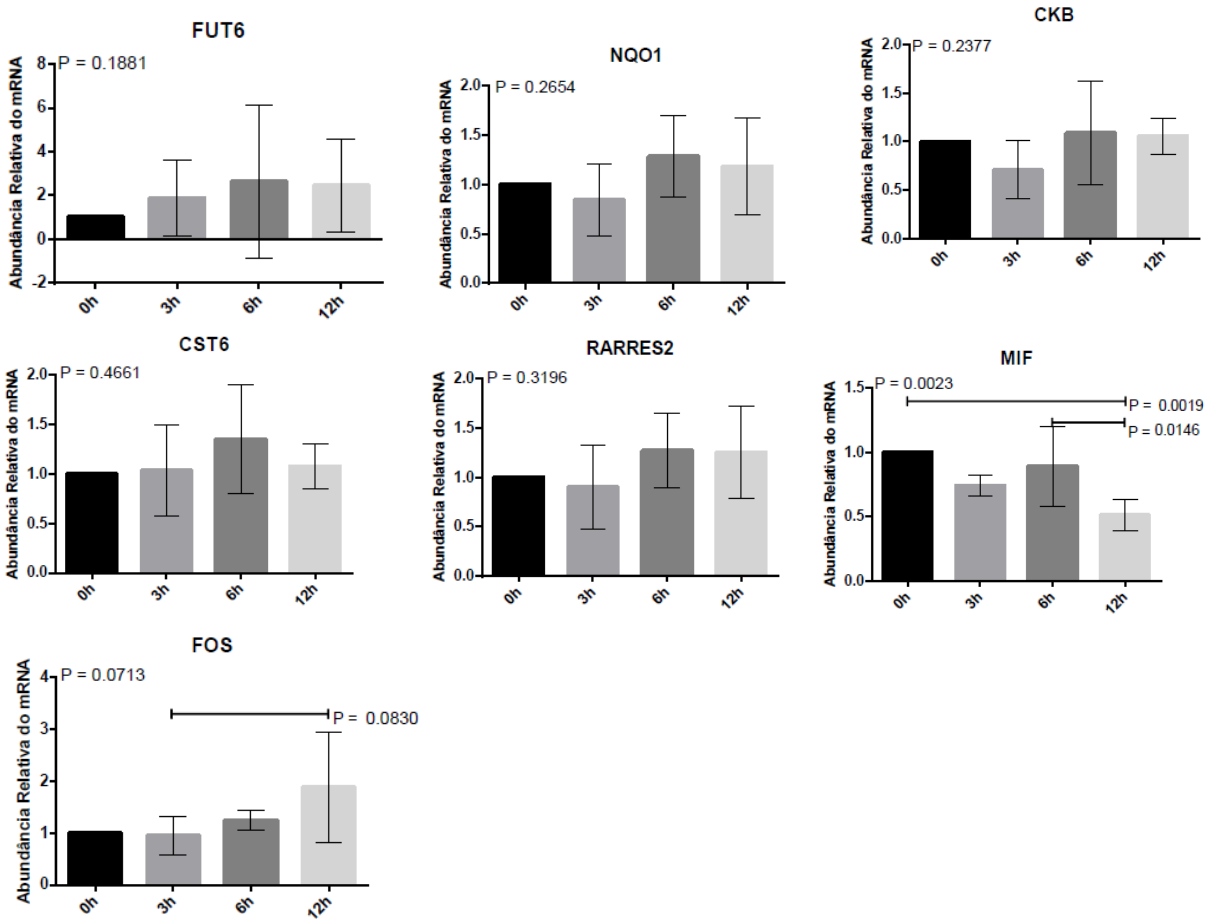

Figura 5: Níveis de abundância relativa (média ± desvio padrão) de RNAm dos genes FUT6, NQ01, CKB, CST6, RARES 2, MIF e FOS em BOEC co-incubadas com espermatozoides na concentração de $1x10^6$ espermatozoides/mL durante 0, 3, 6 e 12 h, e obtidos a partir de 5 réplicas biológicas.

Para os genes FUT6, NQ01, CKB, CST6 e RARRES2 não foi observado efeito do tempo de co-incubação sobre seus níveis de transcritos. Para o gene MIF, quando os agregados foram incubados por 12h houve diminuição na sua expressão (p=0,001) em relação ao grupo controle 0h. Para este mesmo gene quando comparado os grupos de 6 e 12h de incubação, também notou-se diminuição na expressão gênica (p=0,014) após 12 h de co-incubação. O gene B3GNT3 apresentou grande variação entre as repetições, não sendo possível sua avaliação neste experimento. Para o gene FOS, não houve efeito significativo sob o nível de transcritos, entretanto, o valor de "p" após 12 h de co-incubação (p=0,0830), demostra uma tendência em elevar sua expressão no momento de 12h de incubação das BOEC com os espermatozoides.

6. DISCUSSÃO

O reservatório espermático possui a função de assegurar que espermatozoides férteis estejam disponíveis na tuba uterina no momento da ovulação. Os espermatozoides podem permanecer retidos no trato reprodutivo feminino bovino por até 36 h e apenas se separam do epitélio próximo ao momento da ovulação (HOLT; FAZELI, 2016b). Essa sobrevida prolongada dos espermatozoides é especialmente importante para os animais de produção, os quais podem ser cobertos ou inseminados no início do estro.

Neste estudo, para avaliar se os espermatozoides exercem efeito sobre as BOEC, foi utilizado um modelo de cultivo celular *in vitro* em agregados celulares, o qual necessita de um curto tempo de cultivo para a formação desses agregados celulares. Estudos avaliam esta interação *in vitro* utilizando cultivo em monocamadas, em bovinos (KODITHUWAKKU; MIYAMOTO; WIJAYAGUNAWARDANE, 2007; YOUSEF et al., 2016) e suínos (ALDARMAHI et al., 2012). Entretanto, para o estabelecimento do cultivo em monocamadas, é necessário maior tempo de cultivo, o que sabidamente pode causar modificações nas características morfológicas (GUALTIERI et al., 2013) e moleculares (ROTTMAYER et al., 2006) das BOEC. Dentre estas modificações, estão a perda da polaridade celular, dos grânulos secretores, cílios e receptores celulares (GUALTIERI et al., 2013). Desta forma, estas modificações tornam o cultivo em monocamada menos propensas a mimetizar o ambiente fisiológico da tuba uterina.

Outra forma de cultivo das BOEC é através da formação dos agregados, o qual necessita de um curto período de cultivo para sua formação, mantendo as características morfológicas e funcionais celulares (DE PAUW et al., 2002). Este tipo de cultivo vem sendo amplamente utilizado para avaliação da capacidade de ligação dos espermatozoides às BOEC (LUÑO et al., 2013; SARAF et al., 2017). Entretanto, não há relatos de estudos que utilizam este modo de cultivo para avaliar o efeito dos espermatozoides sobre as BOEC.

Para avaliar se o período de cultivo *in vitro* utilizando cultivo de agregados de BOEC, não interfere na fisiologia destas células, foi utilizado um grupo controle, em que os agregados celulares foram mantidos em cultivo por 18h sem a presença dos espermatozoides. Nesta avaliação, não foi encontrado efeito do cultivo sobre o nível de transcritos dos genes avaliados. De acordo com Rottmayer et al., (2006), o cultivo

de BOEC utilizando este mesmo modelo de agregados durante 24h, não apresentou variação na morfologia e expressão dos genes avaliados, além de manter suas características morfológicas e atividade ciliar intensa (LEFEBVRE et al., 1995; SARAF et al., 2017). Isto demonstra uma estabilidade das características destas células neste modelo de cultivo, quando comparadas ao cultivo em monocamada, garantindo maior semelhança das características destas células *in vivo*, ao se utilizar o cultivo de agregados de BOEC.

Assim como o tempo prolongado de cultivo pode provocar modificações nestas células, o estágio do ciclo estral também pode influenciar as mesmas, devido à concentração de estradiol e progesterona circulante (COY et al*.,* 2012). Após a IA ou a monta natural, os espermatozoides progridem pelo trato reprodutivo feminino até chegarem a tuba uterina e formarem os reservatórios de espermatozoides. Esses eventos ocorrem em fase estrogênica, ou seja, com altas concentrações de estradiol circulante (HUNTER, 2012), normalmente ocorrendo a ovulação 12h após o final do estro (NELSON et al., 2017). Portanto, neste estudo foram utilizadas tubas uterinas provenientes do trato reprodutivo cujo ambos os ovários possuíam ausência de CL, sendo utilizado a tuba uterina ipslateral ao ovário que possuía o maior folículo. Desta forma, foi garantido que as células tubáricas estavam sobre efeito do estradiol, com o trato reprodutivo em fase estrogênica, mimetizando o que ocorre naturalmente em monta natural ou IA. Com isto, as alterações dependentes do ciclo estral na morfologia das BOEC, foi controlada.

Outro controle utilizado, foi através da avaliação dos genes em amostras contendo apenas espermatozoides. Isto porque, assim como as demais células, os espermatozoides possuem RNAm, o qual poderia influenciar no nível de transcritos avaliados ao se extrair o RNA em amostras de agregados celulares co-incubados com espermatozoides. Após análise utilizando a mesma quantidade de espermatozoides presentes nos grupos contendo os agregados, não sendo identificado nível de expressão dos genes avaliados. Estudos que avaliam a expressão gênica em espermatozoides, identificaram que a quantidade de RNAm presente nestas células é de aproximadamente 10 a 20 fg de RNAm por célula espermática (BIANCHI et al., 2004; BIANCHI et al 2018; KRAWETZ, 2005). Portanto, a quantidade de RNAm de um espermatozoide é cerca de 200 vezes menor que a quantidade encontrada em células somáticas (GOODRICH; ANTON; KRAWETZ, 2013). Isto, associado a baixa quantidade de espermatozoides presentes nos agregados celulares, pode-se afirmar

que a expressão dos genes avaliados foi proveniente apenas do RNAm extraído das BOEC, sem que haja interferência do RNAm dos espermatozoides.

Em relação aos genes avaliados neste estudo, os mesmos estão envolvidos com adesão, proliferação e diferenciação celular (FUT6, B3GNT3, FOS, CST6, RARRES 2), função imunológica (FUT6, MIF, RARRES 2), metabolismo energético celular (CKB, RARRES 2, MIF), ação antioxidante (NQ01), mobilização de Ca^{2+} (RARRES 2) e apoptose (FOS).

O gene B3GNT3 não apresentou modificação em sua expressão relativa nas BOEC, quando as mesmas foram co-incubadas com duas diferentes concentrações de espermatozoide e em nenhum dos tempos de co-incubação. Este gene é responsável por codificar a glicoproteína GnT-III típica de membrana celular, que está envolvida na biossíntese de cadeias de açúcar, desempenhando um papel regulador na formação de oligossacarídeos (TANIGUCHI; HONKE; FUKUDA, 2011). Os oligossacarídeos fucosilados da superfície celular desempenham um papel na adesão celular (WIEDERSCHAIN et al., 1998). Para formação do reservatório de espermatozoides, estes se ligam as células ciliadas da região do istmo. Esta interação ocorre através da interação de receptores e açucares presentes na membrana plasmática dos espermatozoides e as células ciliadas. Inicialmente ocorre o reconhecimento da fucose pelos espermatozoides (DEFAUS et al., 2016), sugerindo que este gene poderia estar associado a este processo em bovinos.

Outro gene envolvido do processo de adesão celular é o FUT6, o qual também não apresentou modulação em sua expressão. O FUT6 codifica a enzima a3-fucosiltransferase do "tipo plasma” responsável por regular a fucosilação (RYOO; RYU; LEE, 2015), além de participar da síntese do carboidrato sialyl Lewis X, (TANIGUCHI; HONKE; FUKUDA, 2011). Este carboidrato já foi identificado em associação com glicanos ligados à membrana das células epiteliais da tuba uterina de porcas (KADIRVEL et al., 2012), participando da formação do reservatório espermático (MACHADO et al., 2014). Este gene poderia estar associado a este processo de ligação, sugerindo que ocorra a adesão de outras moléculas de carboidrato, como ocorre em outras espécies, sendo que o único carboidrato identificado para a espécie bovina é a fucose.

Dessa forma, está claro que os genes B3GNT3 e FUT6 participam dos processos de ligação molecular entre célula espermática e células epiteliais da tuba uterina, e que juntamente com outros fatores possam influenciar nessa ligação. O

princípio de que estes genes seriam modulados pela interação dos espermatozoides com as BOEC não foi confirmada, mostrando que esta síntese de fatores relacionados ao processo de ligação dos espermatozoides, pode não ser dependentes da presença dos mesmos.

O gene NQO1 não apresentou modulação de sua expressão. Outros fatores na tuba uterina podem estar relacionados ao controle da formação de EROs em que este gene participa. Este gene atua como uma enzima antioxidante, possivelmente pela redução de quinonas, que subsequentemente ajudam a proteger as membranas celulares contra o dano oxidativo (ATIA; ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014). A capacidade dos espermatozoides em gerar espécies reativas de oxigênio é um dos principais contribuintes para o stress oxidativo. Esse stress oxidativo é responsável por danos e comprometimento da função dos espermatozoides, uma vez que os EROs podem gerar danos a diferentes estruturas celulares, incluindo a molécula de DNA (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012).

Em relação ao gene CKB, não foi observado modificação de sua transcrição após interação dos espermatozoides às BOEC. Este gene codifica a enzima creatina kinase B, que catalisa a fosforilação reversível da creatina, para manutenção do reservatório e transporte de energia celular (HALLAK et al., 2001). Sua expressão foi relatada em células do cúmulus pelo estímulo do estradiol em humanos (LEE et al., 2010). Embora não haja relatos na literatura da avaliação deste gene na tuba uterina, o mesmo foi avaliado por estar relacionado ao metabolismo energético celular, uma vez que as células da tuba uterina demandam alta energia durante a fase de formação dos reservatórios, assim como a célula espermática (HAN, 2016).

Para o gene CST6, sabe-se que o início de sua expressão pode ser induzido pela ação da progesterona e expresso em células epiteliais no útero de ovelhas (SPENCER; FORDE; LONERGAN, 2016). Como citado anteriormente, a tuba uterina apresenta modificações de acordo com os níveis circulantes de estradiol e progesterona de forma específica em cada espécie, variando de acordo com o ciclo estral do animal. Entretanto, não se sabe se alterações na tuba uterina de bovinos, podem ter início previamente a ovulação, e consequentemente ao início da fase lútea. Embora o gene CST apresente modificações em sua expressão após o aumento de progesterona, o mesmo não foi encontrado após a ligação dos espermatozoides a estas células, identificando que a função deste gene está mais relacionada a variações hormonais antes e após a ovulação.

O gene RARRES 2 também não apresentou modulação de sua expressão. Este gene é responsável pela formação de uma adipocina envolvida na regulação de adipogênese, metabolismo energético e inflamação (SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK et al., 2009). Desta forma, genes relacionados a resposta inflamatória gerada pela presença dos espermatozoides poderiam ser alterados. As células espermáticas requerem grande quantidade de energia, e reações inflamatórios fisiológicos ocorrem antes da formação dos reservatórios. A chegada dos espermatozoides resulta em quimiotaxia de células inflamatórias com rápido influxo de polimorfonucleares para o lúmen uterino (ALOE et al., 2012). Esta resposta inflamatória é transitória e espermatozoides mortos ou capacitados são alvo primário dos neutrófilos presentes no útero (HOLT; FAZELI, 2016a). RARRES 2 também desencadeia a mobilização do Ca^{2+} (MONNIER et al., 2012). O Ca^{2+} possui importante função relacionada a separação dos espermatozoides das BOEC. Próximo ao momento da ovulação, os espermatozoides se desprendem das BOEC, à qual ocorre simultaneamente ao processo de capacitação espermática (FAZELI et al., 1999), ocorrendo um aumento dos canais intracelulares de Ca^{2+} na membrana plasmática dos espermatozoides (HO; WOLFF; SUAREZ, 2009; KIRICHOK; NAVARRO; CLAPHAM, 2006). A mobilização de Ca^{2+} celular pode estar relacionada a outros genes, regulando o processo de capacitação espermática e liberação dos mesmos das BOEC. Outros genes relacionados ao processo inflamatório também podem responder a presença dos espermatozoides, devendo ser avaliados em estudos futuros.

Em relação ao gene MIF, o presente estudo mostrou que após 18 horas de co-incubação, este gene não apresenta variação em sua expressão. Entretanto, após co-incubação por 12h, foi observada diminuição da expressão de MIF nos agregados de BOECs em relação ao grupo controle 0h, assim como na comparação entre 6 e 12 h de co-incubação. É conhecido que nas BOEC a expressão de sua proteína é maior durante a fase lútea, sendo que altos níveis de estradiol circulante regulam negativamente a expressão de MIF na tuba uterina bovina (NAHAR; KADOKAWA, 2017). O gene MIF está relacionado positivamente a resposta inflamatória, participando da regulação dos macrófagos, ativação de células T e síntese de IgE e apoptose (BIFULCO et al., 2008). A remodelação das BOEC é um passo necessário no processo de preparação de um ambiente ideal para o transporte de gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário. O remodelamento é regulado principalmente pela proliferação, diferenciação e apoptose de células secretoras, e

esses processos parecem ser regulados por alterações endócrinas relacionadas ao ciclo estral (BINELLI et al., 2018). Um estudo *in vivo* realizado em camundongos mostrou que as células secretoras se auto renovam, e também dão origem a células ciliadas (GHOSH; SYED; TANWAR, 2017). Além disso, Ito et al., (2016) concluíram que a proporção de células epiteliais ciliadas e secretoras muda durante o ciclo estral, e que em bovinos, apenas as células secretoras proliferam. Foi demonstrado por Carli et al., (2007) que a proteína MIF na concentração ótima promove a capacitação espermática *in vitro*, e que sua alta expressão pode ser prejudicial a motilidade espermática, enquanto que a baixa concentração de MIF inibe a capacitação. Possivelmente à medida que se aproxima o momento da ovulação, ocorra um equilíbrio na concentração da proteína MIF estimulando a capacitação e liberação de alguns espermatozoides, enquanto o mesmo regula fatores de remodelação celular e fatores inflamatórios previamente a liberação dos espermatozoides. Os espermatozoides, quando presentes na tuba uterina, são alvo de células inflamatórias, principalmente por neutrófilos. Essa resposta é induzida fisiologicamente pela própria presença dos espermatozoides. Possivelmente a resposta da baixa expressão do gene MIF as 12h pode ter sido induzida pela ligação dos espermatozoides as BOEC, diminuindo a resposta de genes pró inflamatórios, como forma de autoproteção à célula espermática. Este gene também está relacionado com a regulação da glicose. É conhecido que a glicose excessiva pode ser prejudicial para a maturação de ovócitos bovinos e o desenvolvimento de embriões em estágio inicial (KUMAR et al., 2012). A resistência à insulina associada ao alto índice de escore corporal, podem causar menor expressão do MIF. Com isto, a expressão de MIF na tuba uterina pode ser regulada negativamente para proteger o embrião (NAHAR; KADOKAWA, 2016). Possivelmente, este gene pode ser responsável por manter níveis de glicose ideais para manutenção das células epiteliais, visto que estas demandam grande energia, além de manter um ambiente propício para os eventos seguintes de fecundação e formação embrionária.

Isto pode fornecer indícios que a regulação da expressão de genes da tuba uterina regulada pela presença dos espermatozoides, pode ocorrer de forma rápida e transitória, uma vez que na avaliação de 18h de co-incubação o gene MIF voltou a ter níveis de expressão semelhante ao do momento 0h.

Em relação ao gene FOS, foi encontrado aumento de sua expressão nas BOEC (P=0,024) após 18h de co-incubação com concentração de $1x10^6$ de

espermatozoides/mL. O gene FOS vem sendo associado a alguns eventos celulares que incluem transformação, proliferação, diferenciação celular e apoptose, sendo que sua transcrição ocorre de maneira rápida e transitória (KARIN; LIU; ZANDI, 1997). É bem documentado que a expressão de FOS aumenta devido a ação do estradiol, e diminui com a luteinização das células da granulosa (RUSOVICI; LAVOIE, 2003). O gene FOS associado ao JUN, ativam a proteína ativadora do fator de transcrição-1 (AP-1), a qual participa da regulação de diversos genes (RAUSCHER et al., 1988). Diante disso sugere-se que o gene FOS seja um importante regulador de processos pré ovulatórios, os quais podem ocorrer inclusive na tuba uterina, preparando o ambiente adequado para manutenção da viabilidade dos gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial. Nesse contexto, o remodelamento adequado pode ser necessário para garantir um ambiente pré ovulatório com aumento da proliferação e diferenciação celular. Além disto, é possível que os espermatozoides causem modulação da expressão do gene FOS, apenas quando uma concentração mínima de espermática está ligado às BOEC, uma vez que a concentração mais baixa utilizada, não foi capaz de causar a mesma modificação.

9. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste estudo, conclui-se que o cultivo *in vitro* de BOEC em agregados não altera a expressão dos genes avaliados. Além disto, a interação de espermatozoides e BOEC modula a expressão do gene FOS *in vitro* quando submetido a cultivo por 18h de incubação em uma concentração de $1x10^6$ espermatozoides/mL. Nessa mesma concentração espermática, o gene MIF apresentou diminuição de sua expressão após 12h de co-incubação em relação ao tempo 0h e 6h de cultivo. Para os demais genes avaliados neste estudo, não foi identificado efeito dos espermatozoides sobre o nível de transcritos, independente da concentração espermática ou tempo de co-incubação utilizados.

10. REFERÊNCIAS

ABE, H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. **Histology and histopathology**, v. 11, n. 3, p. 743-768, 1996.

ALDARMAHI, A. et al. Characterisation of an *in vitro* system to study maternal communication with spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 7, p. 988-998, 2012.

ALMINANA, C. et al. The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 293, 2014.

ALOÉ, S. et al. Modulatory effects of bovine seminal plasma on uterine inflammatory processes. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. 1, p. 12-19, 2012.

ALVAU, A. et al. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. **Development**, p. dev. 136499, 2016.

AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. **Journal of andrology**, v. 33, n. 6, p. 1096-1106, 2012.

AMIN, A. et al. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular reproduction and development**, v. 81, n. 6, p. 497-513, 2014.

ARTEMENKO, K. et al. A proteomic approach to monitor the dynamic response of the female oviductal epithelial cell surface to male gametes. **Journal of proteomics**, v. 113, p. 1-14, 2015.

ATIA, A.; ALRAWAIQ, N.; ABDULLAH, A. A review of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1); A multifunctional antioxidant enzyme. **J Appl Pharm Sci**, v. 4, n. 12, p. 118-22, 2014.

BATTISTONE, M. A. et al. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 19, n. 9, p. 570-580, 2013.

BERGQVIST, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. **Animal reproduction science**, v. 93, n. 1-2, p. 46-60, 2006.

BHURKE, A. S.; BAGCHI, I. C.; BAGCHI, M. K. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. **American journal of reproductive immunology**, v. 75, n. 3, p. 237-245, 2016.

BIANCHI, E. et al. High-quality human and rat spermatozoal RNA isolation for functional genomic studies. **Andrology**, v. 6, n. 2, p. 374-383, 2018.

BIANCHI, P. G. et al. Human cervical mucus can act *in vitro* as a selective barrier against spermatozoa carrying fragmented DNA and chromatin structural abnormalities. **J Assist Reprod Genet** 2004; 21:97–102.

BIFULCO, C. et al. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 36, p. 3790-3801, 2008.

BOVE, S. E. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the bovine corpus luteum: characterization of steady-state messenger ribonucleic acid and immunohistochemical localization. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 4, p. 879-885, 2000.

BOETTGER-TONG, H. L.; MURTHY, L.; STANCEL, G. M. Cellular pattern of c-fos induction by estradiol in the immature rat uterus. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1398-1406, 1995.

BRÜSSOW, K. P. RATKY, J. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. **Reproduction in Domestic Animals**, *43*, 245-251, 2008.

CAILLEAU-THOMAS, A. et al. FUT4 and FUT9 genes are expressed early in human embryogenesis. **Glycobiology**, v. 10, n. 8, p. 789-802, 2000.

CARLI, C. et al. Direct effect of macrophage migration inhibitory factor on sperm function: possible involvement in endometriosis-associated infertility. **Fertility and sterility**, v. 88, n. 4, p. 1240-1247, 2007.

CARVALHO, J. O. et al. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. **Livestock Science** , v. 207, p. 30-37, 2018.

CEBRIAN-SERRANO, A. et al. Effect of the Bovine Oviductal Fluid on *In Vitro* Fertilization, Development and Gene Expression of *In Vitro*-Produced Bovine Blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 331-338, 2013.

CERNY, K. L. et al. A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 84, 2015.

CHANG, H.; SUAREZ, S. S. Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 5, p. 140, 1-8, 2012.

CHEN, S.; EINSPANIER, R.; SCHOEN, J. Long-term culture of primary porcine oviduct epithelial cells: validation of a comprehensive in vitro model for reproductive science. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 862-869, 2013.

CHIMONIDOU, M. et al. CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 235-240, 2013.

CORDOVA, A. et al. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1163-1173, 2014.

COSTACHE, M. et al. Evolution of fucosyltransferase genes in vertebrates. **Journal of Biological Chemistry,** v. 272, n. 47, p. 29721-29728, 1997.

COY, P. et al. Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. **Theriogenology**, v. 4, n. 74, p. 632-642, 2010.

COY, P. et al. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. **Reproduction**, p. REP-12-0279, 2012.

CURTIS, M. P. et al. Modelling a tethered mammalian sperm cell undergoing hyperactivation. **Journal of theoretical biology**, v. 309, p. 1-10, 2012.

DEFAUS, S. et al. Identification of bovine sperm surface proteins involved in carbohydrate-mediated fertilization interactions. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp. M115. 057703, 2016.

DELIDOW, B. C. et al. Regulation of proto-oncogene expression and deoxyribonucleic acid synthesis in granulosa cells of perifused immature rat ovaries. **Biology of reproduction**, v. 47, n. 3, p. 428-435, 1992.

DELIDOW, B. C.; WHITE, B. A.; PELUSO, J. J. Gonadotropin induction of c-fos and c-myc expression and deoxyribonucleic acid synthesis in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 126, n. 5, p. 2302-2306, 1990.

DENG, Q. et al. Expression of N-Acetylglucosaminyltransferase III Promotes Trophoblast Invasion and Migration in Early Human Placenta. **Reproductive Sciences**, p. 1933719118765967, 2018.

DENISON, F. C. et al. Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. **Molecular human reproduction**, v. 5, n. 3, p. 220-226, 1999.

DEORA, A. B. et al. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 42, p. 43411-43418, 2004.

DE PAUW, I. MC et al. Sperm binding to epithelial oviduct explants in bulls with different nonreturn rates investigated with a new *in vitro* model. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1073-1079, 2002.

DIAS, F. C. F. et al. Differential gene expression of granulosa cells after ovarian superstimulation in beef cattle. **Reproduction**, p. REP-13-0114, 2013.

DRUART, X. Sperm interaction with the female reproductive tract. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. s4, p. 348-352, 2012.

ELLINGTON, J. E. et al. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. **Fertility and sterility**, v. 69, n. 4, p. 643-649, 1998.

EL-HANI, C. N. Controvérsias sobre o conceito de gene e suas implicações para o ensino de genética. **V encontro nacional de pesquisa em educação em ciências.** 2005.

EILER, H., NALBANDOV A. V. Sex steroids in follicular fluid and blood plasma during the estrous cycle of pigs. **Endocrinology** 100, no. 2, 331-338, 1977.

ERNST, M. C.; SINAL, C. J. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 11, p. 660-667, 2010.

FAZELI, A. et al. Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 1, p. 60-65, 2004.

FAZELI, A. et al. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 4, p. 879-886, 1999.

FERRAZ, M. A. M. M. et al. Use of transwell cell culture and 3-dimensional printing technology to develop an in vitro bovine oviduct. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 156-156, 2016.

FERRAZ, M. A. M. M. et al. Designing 3-dimensional *in vitro* oviduct culture systems to study mammalian fertilization and embryo production. **Annals of biomedical engineering**, v. 45, n. 7, p. 1731-1744, 2017.

FOTHERINGHAM, S. LEVANON, K. DRAPKIN, R. Ex vivo culture of primary human fallopian tube epithelial cells. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 51, 2011.

GADELLA, B. M.; LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 74-84, 2014.

GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A. et al. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 844, 2016.

GEORGIOU, A. S. et al. Gametes alter the oviductal secretory proteome. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 4, n. 11, p. 1785-1796, 2005.

GEORGIOU, A. S. et al. Modulation of the oviductal environment by gametes. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 12, p. 4656-4666, 2007.

GERKE, V; CREUTZ, C. E.; MOSS, S. E. Annexins: linking Ca 2+ signalling to membrane dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 449, 2005.

GIPSON, I. K. Mucins do endocervix humano. **Frente Biosci** 6,3 D1245-55. 2001.

GOODRICH, R. J.; ANTON, E.; KRAWETZ, S. A. Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. In: **Spermatogenesis**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 385-396.

GHOSH, A; SYED, S. M.; TANWAR, P. S. In vivo genetic cell lineage tracing reveals that oviductal secretory cells self-renew and give rise to ciliated cells. **Development**, v. 144, n. 17, p. 3031-3041, 2017.

GUALTIERI, R. et al. Bovine oviductal monolayers cultured under three-dimension conditions secrete factors able to release spermatozoa adhering to the tubal reservoir *in vitro*. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 429-435, 2013.

GWATHMEY, T. M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-507, 2006.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; SUAREZ, S. S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium *in vitro* and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 3, p. 809-815, 2003.

GWATHMEY, T. M. et al. Interactions of human sperm with cervical and oviductal epithelium: implications for reservoir formation. In: **Biology of Reproduction**. 1603 MONROE ST, MADISON, WI 53711-2021 USA: SOC STUDY REPRODUCTION, 2003. p. 265-265.

HALLAK, J. et al. Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. **Urology**, v. 58, n. 3, p. 446-451, 2001.

HAN, Y.; PEÑAGARICANO, F. Unravelling the genomic architecture of bull fertility in Holstein cattle. **BMC genetics**, v. 17, n. 1, p. 143, 2016.

HESS, J.; ANGEL, P.; SCHORPP-KISTNER, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. **Journal of cell science**, v. 117, n. 25, p. 5965-5973, 2004.

HO, K.; WOLFF, C. A.; SUAREZ, S. S. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 2, p. 345-350, 2009.

HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999.

HOLT, W. V.; FAZELI, A. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms, and new opportunities. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 105-112, 2016a.

HOLT, W. V.; FAZELI, A. Sperm storage in the female reproductive tract. **Annual review of animal biosciences**, v. 4, p. 291-310, 2016b.

HOLT, W. V.; FAZELI, A. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 11, p. 934-943, 2010.

HUNTER, R. H. F. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. **Biological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 244-255, 2012.

HUNTER, R. H. F.; GADEA, J. Cross-talk between free and bound spermatozoa to modulate initial sperm: egg ratios at the site of fertilization in the mammalian oviduct. **Theriogenology**, v. 82, n. 3, p. 367-372, 2014.

HUNTER, R. H. F. et al. Temperature gradients in female reproductive tissues and their potential significance. **Anim Reprod**, v. 6, p. 7-15, 2009.

IGNOTZ, G. G. 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**, 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. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 906-913, 2007.

ITO, S. et al. Remodeling of bovine oviductal epithelium by mitosis of secretory cells. **Cell and tissue research**, v. 366, n. 2, p. 403-410, 2016.

JIN, X. L.; O'NEILL, C. Regulation of the expression of proto-oncogenes by autocrine embryotropins in the early mouse embryo. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 6, p. 1216-1224, 2011.

JOSEPH, R. T.; COCHRANE, F.; WILTBANK, M. C. Methods for synchronization of estrous cycles and ovulation for fixed time artificial insemination in cattle. **U.S. Patent Application** n. 14/699,904, 9 mar. 2017.

JOSHI, M. S. Isolation, cell culture, and characterization of oviduct epithelial cells of the cow. **Microscopy research and technique**, v. 31, n. 6, p. 507-518, 1995.

KADIRVEL, G. et al. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 147, 1-11, 2012.

KARIN, M.; LIU, Z.; ZANDI, E. AP-1 function and regulation. **Current opinion in cell biology**, v. 9, n. 2, p. 240-246, 1997.

KAYA, H. S. et al. Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization. **Molecular endocrinology**, v. 29, n. 6, p. 882-895, 2015.

KIM, J. Y. et al. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. **Endocrinology**, v. 154, n. 8, p. 2912-2923, 2013.

KESSLER, M. et al. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. **Nature communications**, v. 6, p. 8989, 2015.

KIRKLAND, J. L.; MURTHY, L. A. T. A.; STANCEL, G. M. Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3223-3230, 1992.

KIRICHOK, Y.; NAVARRO, B.; CLAPHAM, D. E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca 2+ channel. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 737, 2006.

KODITHUWAKKU, S. P.; MIYAMOTO, A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B. Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1087-1094, 2007.

KRAWETZ, S. A. Paternal contribution: new insights and future challenges. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 633, 2005.

KUBISCH, H. M. et al. Determinantes genéticos e ambientais da secreção de interferon-τ por blastocistos bovinos in vivo e derivados *in vitro*. **Ciência da reprodução animal**, v. 66, n. 1-2, p. 1-13, 2001.

KUMAR, P. et al. Effect of varying glucose concentrations during *in vitro* maturation and embryo culture on efficiency of *in vitro* embryo production in buffalo. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. 2, p. 269-273, 2012.

LAMY, J. et al. Regulation of the bovine oviductal fluid proteome. **Reproduction**, p. REP-16-0397, 2016 a.

LEE, M. et al. Association of creatin kinase B and peroxiredoxin 2 expression with age and embryo quality in cumulus cells. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 27, n. 11, p. 629-639, 2010.

LEE, S. et al. Oocyte maturation-related gene expression in the canine oviduct, cumulus cells, and oocytes and effect of co-culture with oviduct cells on *in vitro* maturation of oocytes. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 34, n. 7, p. 929-938, 2017.

LEFEBVRE, R. et al. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 5, p. 1066-1074, 1995.

LEFEBVRE, R.; LO, M. C.; SUAREZ, S. S. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 5, p. 1198-1204, 1997.

LI, S. et al. Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus. **Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center**, v. 38, n. 2, p. 78-84, 2003

LI, X. et al. Oocyte-Specific Expression of Mouse MEX3C652AA in the Ovary and Its Potential Role in Regulating Maternal Fos mRNA. **Biology of reproduction**, v. 94, n. 5, p. 115, 1-15, 2016.

LI, L. et al. Expression of chemerin and its receptors in rat testes and its action on testosterone secretion. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p. 155-163, 2014.

LIU, J. et al. Identification of gene expression changes in rabbit uterus during embryo implantation. **Genomics**, v. 107, n. 5, p. 216-221, 2016.

LOPES, F. et al. Sheep (Ovis aries) Macrophage Migration Inhibitory Factor: molecular cloning, characterization, tissue distribution and expression in the ewe reproductive tract and in the placenta. **Cytokine**, v. 54, n. 3, p. 315-323, 2011.

LÓPEZ-ÚBEDA, R. et al. Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. **Asian journal of andrology**, v. 19, n. 4, p. 396, 2017.

LUÑO, V. et al. Tyrosine phosphorylation on Percoll-washed sperm incubated with porcine oviductal explants. **XV Jornadas sobre Producción Animal**, p. 386-388, 2013.

MACHADO, G. M. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-1297, 2009.

MACHADO, S. A. et al. LewisX-containing glycans on the porcine oviductal epithelium contribute to formation of the sperm reservoir. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 6, 2014.

MACHER, B. A. et al. A-3-3 fucosiltransferases humanas. **Glicobiologia** , v. 1, n. 6, p. 577-584, 1991.

MAILLO, V. et al. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: evidence from in vivo and in vitro studies. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 443-450, 2016.

MAZUR, E. C. et al. Progesterone receptor transcriptome and cistrome in decidualized human endometrial stromal cells. **Endocrinology**, v. 156, n. 6, p. 2239-2253, 2015.

MERKL, M. et al. Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 83, n. 5, p. 874-886, 2010.

MILLER, D. J. Regulation of sperm function by oviduct fluid and the epithelium: insight into the role of glycans. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, p. 31-39, 2015.

MONNIER, J. et al. Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. **The Journal of Immunology**, p. 1102871, 2012.

MORALES, P. et al. Fertilization and early embryology: Sperm interaction with human oviductal cells in vitro. **Human reproduction**, v. 11, n. 7, p. 1504-1509, 1996.

NAGPAL, S. et al. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 1, p. 91-95, 1997.

NAHAR, A.; KADOKAWA, H. Expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bovine oviducts is higher in the postovulatory phase than during the oestrus and luteal phase. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 8, p. 1521-1529, 2017.

NAHAR, A.; KADOKAWA, H.. Suppressed expression of macrophage migration inhibitory factor in the oviducts of lean and obese cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 6, p. 655-662, 2016.

NARASIMHAN, S. Control of glycoprotein synthesis. UDP-GlcNAc: glycopeptide beta 4-N-acetylglucosaminyltransferase III, an enzyme in hen oviduct which adds GlcNAc in beta 1-4 linkage to the beta-linked mannose of the trimannosyl core of N-glycosyl oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 17, p. 10235-10242, 1982.

NELIS, H. et al. Equine oviduct explant culture: a basic model to decipher embryo–maternal communication. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 7, p. 954-966, 2014.

NELSON, S. T. et al. Automated activity monitoring and visual observation of estrus in a herd of loose housed Hereford cattle: Diagnostic accuracy and time to ovulation. **Theriogenology**, v. 87, p. 205-211, 2017.

OKABE, M. Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 4, p. 646, 2015.

ORIHUELA, P. A. et al. Mating changes the subcellular distribution and the functionality of estrogen receptors in the rat oviduct. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 139, 2009.

ORR T. J; ZUK, M. Reproductive delays in mammals: an unexplored avenue for post-copulatory sexual selection. **Biological Reviews**. 2014 Nov;89(4):889-912.

PAULESU, L. et al. Variation in macrophage-migration-inhibitory-factor immunoreactivity during porcine gestation. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 4, p. 949-953, 2005.

PFAFFL, M.W. Relative Quantification. In 'Real-time PCR. **Taylor & Francis: London** (Ed. MT Dorak.) p. 63-82, 2006.

POLLARD, J. W. et al. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. **Biology of reproduction**, v. 44, n. 1, p. 102-107, 1991.

POKHAREL, K. et al. Integrated ovarian mRNA and miRNA transcriptome profiling characterizes the genetic basis of prolificacy traits in sheep (Ovis aries). **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 104, 2018.

RAUSCHER, F. J. D. et al. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution *in vitro*. **Genes & development**, v. 2, n. 12b, p. 1687-1699, 1988.

RAYNAL, P; POLLARD, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1197, n. 1, p. 63-93, 1994.

REGASSA, A. et al. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 57, 2011.

REISCHL, J. et al. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro. **Cell and tissue research**, v. 296, n. 2, p. 371-383, 1999.

REVERCHON, M. et al. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. **Human Reproduction**, v. 27, n. 6, p. 1790-1800, 2012.

REVERCHON, M. et al. CHEMERIN (RARRES2) decreases *in vitro* granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species. **Biology of reproduction**, v. 90, n. 5, 2014.

RIJSSELAERE, T. et al. Current knowledge on the transport and fate of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s2, p. 2-7, 2014.

RIZOS, D. et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589-595, 2002.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology.** 2007 Sep 1;68:S138-46.

ROTTMAYER, R. et al. A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo–maternal interactions: morphological and functional characterization. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 637-648, 2006.

RUSOVICI, R.; LAVOIE, H. A. Expression and distribution of AP-1 transcription factors in the porcine ovary. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 1, p. 64-74, 2003.

RYOO, H.; RYU, J.; LEE, C. Transcriptional downregulation by nucleotide substitution with the minor allele of rs3760776 located in the promoter of FUT6 gene. Biochemical genetics, v. 53, n. 4-6, p. 72-78, 2015.

SARAF, K. K. et al. Development of an *in vitro* oviduct epithelial explants model for studying sperm–oviduct binding in the buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 687-691, 2017.

SCHMALTZ-PANNEAU, B. et al. Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during *in vitro* co-culture. **Animal reproduction science**, v. 149, n. 3-4, p. 103-116, 2014.

SCHOEN, J. et al. Establishment and characterization of an adherent pure epithelial cell line derived from the bovine oviduct. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 536-545, 2008.

SHAO, C. et al. Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31689-31695, 2006.

SIEGEL, D.; ROSS, D. Immunodetection of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 246-253, 2000.

SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK, J. et al. Potential role of chemerin in recruitment of plasmacytoid dendritic cells to diseased skin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 380, n. 2, p. 323-327, 2009.

SMITHSON, G. et al. Fuc-TVII is required for T helper 1 and T cytotoxic 1 lymphocyte selectin ligand expression and recruitment in inflammation, and together with Fuc-TIV regulates naive T cell trafficking to lymph nodes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 5, p. 601-614, 2001

SOUZA, F. A. et al. Fertilization and Oocyte Activation in Mammalians. **Revista Ciência Animal**. Nº7, pp.43-57 /2014.

SPENCER, T. E.; FORDE, N.; LONERGAN, P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 7, p. 5941-5950, 2016.

SRIVASTAVA, N. et al. Bovine seminal PDC-109 protein: An overview of biochemical and functional properties. **Animal reproduction science**, v. 138, n. 1, p. 1-13, 2013.

SUAREZ, S.; et al. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct *in vitro*: possible role in formation of a sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 998–1004, 1991.

SUAREZ, S. S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 3, p. 140-143, 2002.

SUAREZ, S. S.; BROCKMAN, K.; LEFEBVRE, R. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 2, p. 447-453, 1997.

SUAREZ, S. S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. **Cell and tissue research**, v. 363, n. 1, p. 185-194, 2016.

SUAREZ, S. S.; WU, M. Microfluidic devices for the study of sperm migration. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 23, n. 4, p. 227-234, 2016.

SUAREZ, S. S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 5-6, p. 455-462, 2004.

SUZUKI, H.; KANAGAWA, H.; NISHIHIRA, J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. **Immunology letters**, v. 51, n. 3, p. 141-147, 1996.

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

TAN, B. K. et al. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. **Diabetes**, 2009.

TANIGUCHI, N.; HONKE, K.; FUKUDA, M. (Ed.). Handbook of glycosyltransferases and related genes. **Springer Science & Business Media**, 2011.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS letters**, v. 285, n. 2, p. 213-219, 1991

ULBRICH, S. E. et al. In vitro systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. **Theriogenology**, v. 73, n. 6, p. 802-816, 2010.

VEENA, M. S. et al. Inactivation of the cystatin E/M tumor suppressor gene in cervical cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 47, n. 9, p. 740-754, 2008.

VISCONTI, P. E. et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of reproductive immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 133-150, 2002.

WADA, S. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the human ovary: presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. **IUBMB Life**, v. 41, n. 4, p. 805-814, 1997.

WANG, Q. et al. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. **Endocrinology**, v. 153, n. 11, p. 5600-5611, 2012.

WANG, B.; GOFF, A. K. Interferon-τ stimulates secretion of macrophage migration inhibitory factor from bovine endometrial epithelial cells. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1690-1696, 2003.

WAY A. L.; KILLIAN G. J. Capacitation and induction of the acrosome reaction in bull spermatozoa with norepinephrine. **Journal of andrology**. May 6;23(3):352-7, 2002.

WIEDERSCHAIN, G. Y. et al. α1, 3 fucosyltransferase, α-L-fucosidase, α-D-galactosidase, β-D-galactosidase, and Lex glycoconjugates in developing rat brain. **Glycoconjugate journal**, v. 15, n. 4, p. 379-388, 1998.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. et al. *In vitro* regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. **Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 117- 130, 2001.

WITTAMER, V. et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 7, p. 977-985, 2003.

WROBEL, K.-H.; KUJAT, R.; FEHLE, G. The bovine tubo uterine junction: general organization and surface morphology. **Cell and tissue research**, v. 271, n. 2, p. 227-239, 1993.

YANIZ, J. L. et al. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. **The Anatomical Record**, v. 260, n. 3, p. 268-278, 2000.

YANIZ, J. L. et al. Three-Dimensional Architecture of the Ovine Oviductal Mucosa. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 43, n. 5, p. 331-340, 2014.

YANIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F. Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 35, n. 1, p. 28-34, 2006.

YESTE, M. et al. Viable and morphologically normal boar spermatozoa alter the expression of heat-shock protein genes in oviductal epithelial cells during co-culture *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 81, n. 9, p. 805-819, 2014.

YOSHIDA, A.; NEWBOLD, R. R.; DIXON, D. Abnormal cell differentiation and p21 expression of endometrial epithelial cells following developmental exposure to diethylstilbestrol (DES). **Toxicologic pathology**, v. 28, n. 2, p. 237-245, 2000.

YOUSEF, M. S. et al. Sperm binding to oviduct epithelial cells enhances TGFB1 and IL10 expressions in epithelial cells as well as neutrophils in vitro: prostaglandin E2 as a main regulator of anti-inflammatory response in the bovine oviduct. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162309, 2016.

YUDIN, A. I., et al. "The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glycocalyx." **The Journal of membrane biology** 207.3 119-129. 2005.

ZHAO, Y. et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. **Cancer science**, v. 99, n. 7, p. 1304-1310, 2008.

ZHANG, W. et al. B3GNT3 expression is a novel marker correlated with pelvic lymph node metastasis and poor clinical outcome in early-stage cervical cancer. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144360, 2015.