

SEMEN SEXADO:

Otra biotecnología reproductiva al servicio del ganadero

La citometría de flujo ha sido la única técnica de manejo del semen para determinación del sexo con resultados confiables, repetibles y que ha reportado resultados en vivo con crías saludables y reproductivamente funcionales. Ésta se fundamenta en la separación de espermatozoides por la cantidad de ADN localizado en su cromosoma sexual. En bovinos la diferencia de cantidad de ADN en espermatozoides con cromosoma X (que genera individuos de sexo femenino) es 3.8% mayor que la del espermatozoide portador del cromosoma Y (que produce machos). Durante el proceso de sexado el espermatozoide es sometido a colorantes, alta presión y a rayos láser, lo que ocasiona su deterioro a varios niveles y la disminución de la cantidad de espermatozoides y su capacidad fecundante. Las mejores tasas de preñez mediante inseminación artificial se han logrado en novillas y se encuentra entre el 70 y el 85% de las tasas de preñez logradas con semen convencional. En vacas los resultados son mucho menores. La utilización de semen sexado en producción de embriones por superovulación o fertilización in vitro, ha mostrado resultados inferiores a los logrados con semen convencional. La técnica de semen sexado posibilita obtener más animales de genética superior con el sexo deseado en los hatos, pero se deben hacer mayores esfuerzos encaminados a mejorar la técnica de sexaje, minimizar el efecto lesivo del sexaje sobre el espermatozoide, incrementar los índices de fertilidad y disminuir sus costos, con miras a lograr su masificación para beneficio de la producción animal.

M.V. Juan Fernando Vásquez C.
Candidato a M.Sc. en Ciencias Animales
Universidad de Antioquia.
Coordinador Programa de Inseminación
Artificial COLANTA
juanve@colanta.com.co

El semen sexado es una de las biotecnologías de mayor crecimiento durante los últimos años en la industria ganadera. Su éxito en lechería radica en la mayor proporción de crías hembras para reemplazos provenientes de toros probados de genética de alta selección en los hatos involucrados, mientras en hatos de carne facilita mayor proporción de machos, con mejores ganancias de peso y menor tiempo al sacrificio. La tecnología mediante la que se realiza el sexado, la citometría de flujo, es el resultado de avances en computación, biofísica, biología celular, instrumentación y fisiología reproductiva aplicada y ha sido la única técnica de sexaje confiable, repetible y que ha reportado resultados en vivo con crías saludables y reproductivamente funcionales¹⁸. Tradicionalmente se ha manejado el concepto de que la expectativa de producir machos y hembras está en una relación 50%:50%. Sin embargo, algunos estudios plantean una mayor proporción de machos en programas de inseminación artificial, transferencia de embriones, fertilización in vitro, en vacas muy viejas y en fincas con alto nivel de manejo⁸. Esto hace que se justifique el trabajo con semen sexado en múltiples explotaciones lecheras.

UN POCO DE HISTORIA

Desde los inicios de la domesticación el hombre ha querido definir el sexo de sus animales de acuerdo con sus necesidades, y desde ese tiempo ha intentado dar explicación al origen del sexo de las especies. Es así como desde el siglo V A.C., el griego Demócrito postuló que los machos a través de su testículo derecho producían machos, mientras que a través de su testículo izquierdo producían hembras⁸.



Inseminación artificial.

Durante el siglo XVII se realizó el descubrimiento del espermatozoide, su función en 1841; el óvulo femenino fue descubierto en 1827. Por su parte la fecundación fue esclarecida a finales de ese siglo².

En 1910, Guyer descubrió que el sexo estaba determinado por el tipo de cromosoma sexual que se encuentre en el espermatozoide⁹. Desde la década de los 80' se realizaron diversidad de ensayos en el intento de separar espermatozoides por sexo con base en su tamaño, peso, densidad, velocidad de desplazamiento, proteínas de superficie, efectos en diferente pH, diferencias en cargas eléctricas, diferencias morfológicas del núcleo y cabeza

del espermatozoide o presión atmosférica, con resultados no muy consistentes y poco repetibles^{2,8}.

En 1979, Moruzzi reseñó que los espermatozoides tenían diferencias en el tamaño del cromosoma sexual entre machos y hembras (Tabla 1), y determinó que la diferencia en bovinos era del 4.2% aproximadamente⁸.

En 1982, científicos de la Universidad de Oklahoma y el Laboratorio Nacional Lawrence Livermore descubrieron que mediante la técnica de citometría de flujo era posible identificar poblaciones de espermatozoides X y Y con base en sus diferencias en el contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) de su núcleo⁸.

Tabla 1. Diferencias en el tamaño de los cromosomas sexuales en diferentes especies (X-Y) (Adaptado de Johnson) [9]

ESPECIE	DIFERENCIA	ESPECIE	DIFERENCIA
Chinchilla	7.5%	Cerdo	3.6%
Carnero	4.2%	Elefante	3.4%
Perro	3.9%	Camello	3.3%
Toro	3.8%	Conejo	3.0%
Alce	3.8%	Hombre	2.8%
Caballo	3.7%	Zarigüeya	2.3%

Hasta este momento, había que matar los espermatozoides y separar su núcleo para poder medir su cantidad de ADN. Sólo fue hasta 1987 que Johnson descubrió la posibilidad de diferenciar la cantidad de ADN

mediante la tinción del núcleo con un colorante basado en fluorocromo, denominado Hoechst 33342^{6,9}.

En 1989 científicos del Centro de Investigación Beltsville del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) lograron la primera gestación de semen sexado en conejas, con un éxito de 81% en obtener machos y 94% en hembras.

En 1993 se reportó la primera gestación producto de fertilización in vitro con semen sexado².

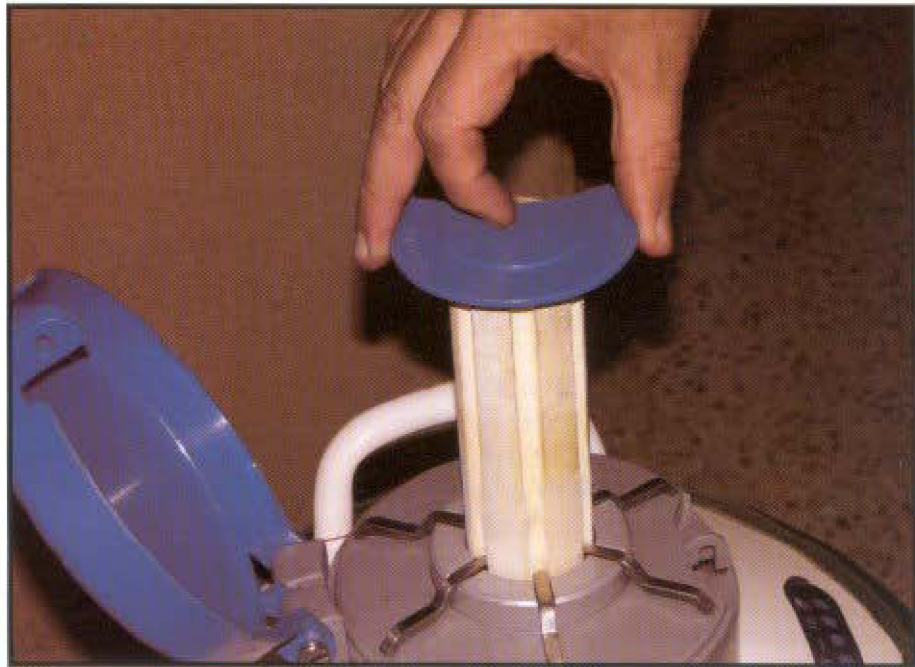
En 1999 se reportaron los primeros casos exitosos de preñeces con semen sexado congelado bovino⁸.

La comercialización de semen inicialmente la realizó la empresa XY Inc., mediante el esfuerzo conjunto de la Universidad de Colorado, Cytomation Inc., e investigadores privados⁸.

EFICIENCIA DEL SEXAJE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La diferenciación sexual en mamíferos es un proceso que se inicia en el momento de la fecundación. El espermatozoide portador del cromosoma Y determinará la formación de un individuo de sexo masculino, y el espermatozoide X la formación de individuo de sexo femenino². El cromosoma Y en mamíferos es siempre de menor tamaño que el X. Esta diferencia de tamaño es la que aprovecha la citometría de flujo para la diferenciación del cromosoma sexual portado por el espermatozoide, y por lo tanto del sexo a esperar en la descendencia.

La eficiencia en la obtención de espermatozoides del sexo deseado



Termo para almacenamiento de semen.

depende en sus resultados de las diferencias de tamaño del cromosoma X y Y de cada especie. En ciertas especies en que la diferencia de tamaño de los cromosomas sexuales es grande, la eficiencia del sexaje es mayor. Por ejemplo, en la chinchilla la eficiencia en el sexado del semen puede llegar al 100%, mientras que en el hombre, la eficiencia en presentar nacimientos del sexo deseado puede oscilar entre el 75 y el 90%, dada la mayor dificultad de separación de espermatozoides⁹.

EFICIENCIA DEL SEXADO EN BOVINOS

Como se vio en la tabla anterior, el sexado en bovinos se basa en diferencias de tamaño cromosómico de 3.8% aproximadamente. Sin embargo, se han encontrado diferencias notorias entre razas. Es así como la diferencia en el contenido de ADN de los cromosomas X-Y en toros jersey es de 4.24%, en angus 4.05%, hereford 4.03%, holstein 3.98% y brahman 3.73%³. Múltiples ensayos de campo sitúan la eficiencia del sexado en bovinos alrededor del 90%. Algunos de los resultados de estos estudios se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Eficiencia en el sexado en ensayos con semen bovino

Raza	Selección de sexado	Número de partos	No. De nacimientos del sexo deseado	Eficiencia de sexaje	Autor
Varias razas	Macho	954	838	87.8%	Tubman <i>et al.</i> [21]
	Hembra	215	198	92.1%	
Angus negro	Hembra	129	119	92%	Seidel <i>et al.</i> [19]
Holstein	Hembra	215	178	83%	Seidel <i>et al.</i> [19]

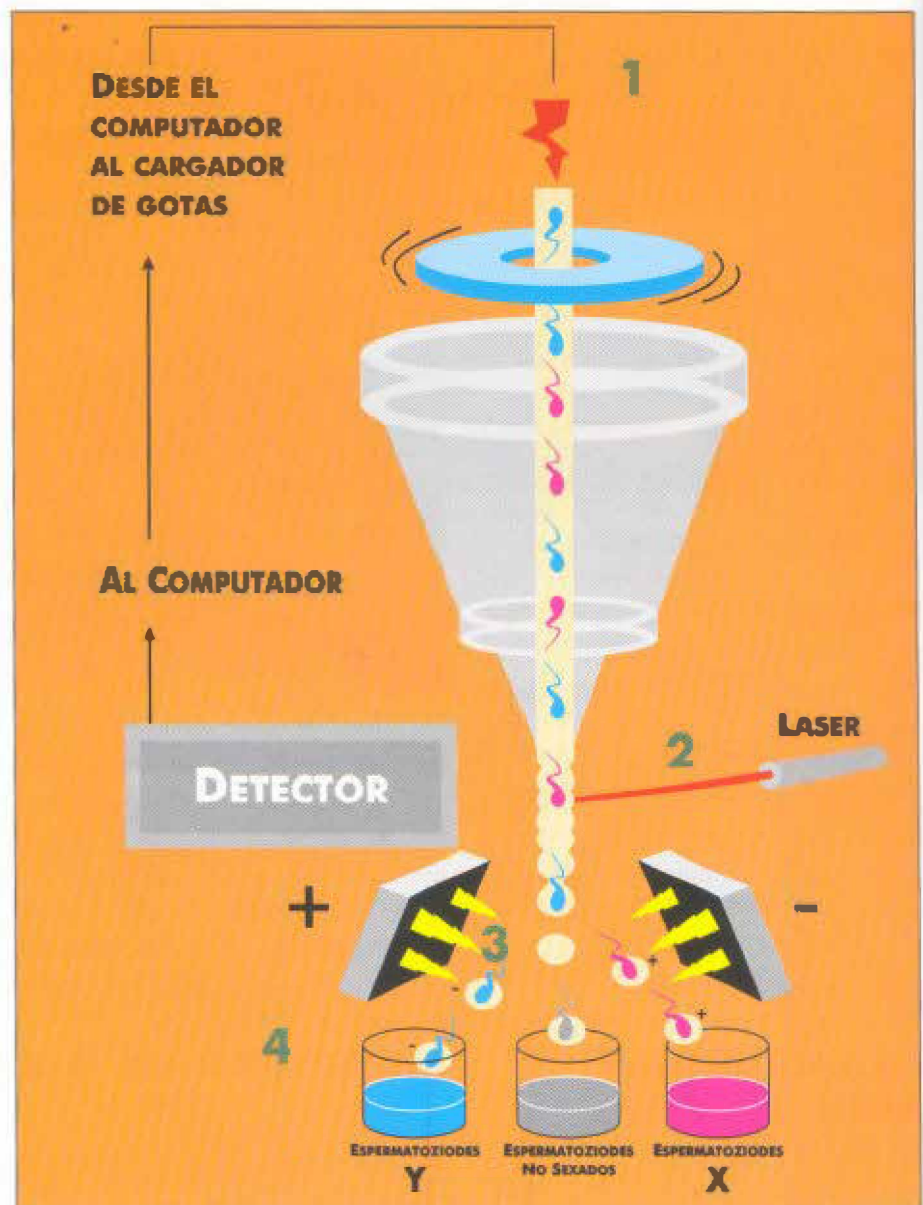
CÓMO FUNCIONA LA TÉCNICA

El proceso de sexaje de mayor tasa de repetibilidad en cuanto a sus resultados, es el llevado a cabo por la citometría de flujo.

El proceso del semen inicia con la colecta del mismo mediante la técnica de vagina artificial. Es normal trabajar con semen cuya motilidad progresiva sea superior al 50% y 75% de morfología normal¹⁹. Este

semen se deja en reposo a 20-23°C durante 8 horas antes del proceso. Durante este tiempo los espermatozoides se diluyen a 150 millones/ml, y estabilizan en medio Tyrode suplementado con albúmina, lactato, piruvato y el colorante marcador H333342. Pasado este tiempo, el semen es adicionado con Tris, o con solución buffer fosfatada (PBS) + albúmina de suero bovino (BSA) y pasado a través del separador de espermatozoides a una velocidad de 90 kms/hora y a presiones que oscilan entre 0.84 Kg./cm² hasta 4.22 Kg./cm². (Paso 1 en la gráfica).

Un láser de argón se utiliza para excitar el colorante unido al ADN del espermatozoide. Para esto, la orientación de la cabeza del espermatozoide con respecto al rayo láser y los detectores ópticos es crítico para la resolución del sistema⁹. (Paso 2 en la gráfica) Detectores de fluorescencia determinan la intensidad de la coloración basados en la diferencia de contenido de ADN de los cromosomas X e Y. Por otro lado, micro gotas son cargadas eléctricamente según el tipo de cromosoma sexual que porte el espermatozoide y separados por placas cargadas eléctricamente. (Paso 3 en la gráfica) Cada micro gota que contiene un espermatozoide será desplazada en una dirección con base en la presencia del cromosoma X o Y. (Paso 4 en la gráfica) Las micro gotas caen a un extendido de yema de huevo con diluyente TRIS. El semen resultante es concentrado por centrifugación y empaclado en minipajillas de 0.25 ml para su congelación en vapores de nitrógeno^{8,17}. Los sistemas más modernos de sexaje separan hasta 40.000 espermatozoides por segundo⁹. De trabajar a una



Adaptado de Hansen [23].

tasa de 20.000 espermatozoides por segundo se pueden obtener entre 2.500 y 4.000 espermatozoides separados para cada sexo¹⁹. El resto de los espermatozoides son descartados y acá se incluyen espermatozoides muertos, mal coloreados, no sexados y células epiteliales provenientes del eyaculado. Si después del proceso de sexaje la motilidad es inferior al 30%, se recomienda el descarte del semen sexado¹⁹.

EFFECTOS ADVERSOS SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES

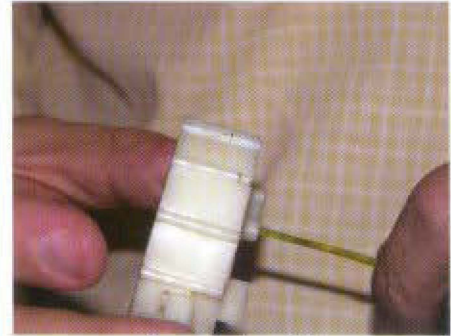
El proceso de sexado puede ocasionar daños en los espermatozoides y en la estructura del ADN por efecto del colorante, del rayo láser y del paso a alta presión por el equipo. Estos daños pueden afectar la motilidad, viabilidad y la integridad de membrana. El proceso de dilución además puede remover algunas moléculas protectoras ubicadas en los diluyentes o el plasma seminal y ocasionar reacciones prematuras del acrosoma². El colorante Hoechst 33342 puede ocasionar daño cromosomal bajo ciertas condiciones¹⁰. Y sexado a alta presión se ha asociado a fertilidad disminuida¹⁴. La congelación por su parte, puede afectar la motilidad del semen y la integridad del acrosoma¹⁰. Estudios recientes¹⁴, contradicen algunos de estos conceptos



Extracción de pajilla de termo de enfriamiento.



Colocación de pajilla en pistola de inseminación.



Despunte de pajilla.

al afirmar que no hubo efecto sobre las tasas de preñez debidas al colorante Hoechst 33342 o a la intensidad del láser. Otros autores afirman que las fuerzas mecánicas y la alta presión del sexado son las causantes de muchos de los daños del espermatozoide⁷. El proceso de sexado a 40 psi, es mucho menos dañino para integridad del espermatozoide que el sexado a 50 psi. En la práctica el sexado a menor presión se ha traducido en mejores tasas de preñez en novillas²⁰.

Hay estudios que demuestran que con el uso del semen sexado no se incrementa la tasa de abortos, la duración de la gestación, la dificultad de parto, la muerte neonatal, el peso al nacimiento o al destete comparado con animales del mismo sexo nacidos por inseminación con semen convencional²¹.

La tecnología de semen sexado se ha replicado con éxito en bovinos, ovinos, porcinos, equinos, caninos, conejos, gatos, delfines, primates y el hombre⁸.

EL EFECTO DEL TORO EN LA FERTILIDAD DEL SEMEN SEXADO

Se ha demostrado que el factor toro influye notoriamente el desempeño en fertilidad del semen sexado. Estudios realizados por Den Daas et al.⁵, reportan que el 95% de la máxima tasa de concepción en vacas con semen sexado se logró con rangos que oscilaron entre 1 y 10 millones de espermatozoides por dosis y que estas diferencias fueron

principalmente atribuidas al toro utilizado. También concluyeron que el 20% de los toros presentaron alta fertilidad y altas tasas de concepción con bajas dosis de espermatozoides, que otro 20% de los toros presentó baja fertilidad y que estos continuaron con baja fertilidad a pesar de que se incrementó la dosis de espermatozoides. Este es el motivo por el cual algunos de los toros de alto mérito genético no son comercializados en presentación de semen sexado.

USO COMERCIAL DEL SEMEN SEXADO

Múltiples estudios coinciden en que el semen sexado debe usarse principalmente en novillas debido a su mayor fertilidad y al limitado número de espermatozoides por pajilla^{8,19}. En condiciones normales, una pajilla de semen convencional

contiene entre 20 y 40 millones de espermatozoides congelados; en contraste, el semen sexado comúnmente contiene entre 1.5 y 2 millones de espermatozoides congelados (Tabla 3). Con estas cantidades de espermatozoides se han logrado entre el 70 y el 90% de las tasas de preñez logradas con semen convencional¹⁹. Incrementar la dosis de espermatozoides de 2 a 6 millones en novillas no incrementó los porcentajes de preñez en un estudio realizado¹⁹.

Ante la menor cantidad de espermatozoides aplicados por pajilla, se ha propuesto la inseminación intrauterina profunda (en el fondo del cuerno uterino), como alternativa para mejorar porcentajes de preñez. Estudios realizados por Seidel et al.¹⁹ mostraron que las tasas de preñez fueron similares en aplicación de

Tabla 3. Resultados de múltiples estudios en % de preñez de semen sexado vs. semen convencional, en vacas y novillas:

Tipo animal	Raza	Número de inseminaciones	% Preñez	% Concepción vs. semen convencional	Autor
Novilla	Holstein	16587 (Varios hatos)	Promedio 44% (Máximo 72% mínimo 33%)	85% +/- 3%	DeJarnette et al. [4]
Vaca	Holstein	157	21%	45.7%	Andersson et al. [1]
Novilla	Jersey	825	57%	---	Garner y Seidel [8]
Vaca	Jersey	3285	39%	---	Garner y Seidel [8]
Novilla	Angus negro*	123	54%	80.6%	Seidel et al. [19]
Novilla	Angus rojo*	211	54%	80.6%	Seidel et al. [19]
Novilla	Holstein*	288	43%	69.4%	Seidel et al. [19]
Vaca	Angus**	42	57%	75%	Seidel et al. [19]

* Inseminadas con semen sexado a 1.5 millones de espermatozoides / dosis

** Inseminadas con semen sexado a 3 millones de espermatozoides / dosis

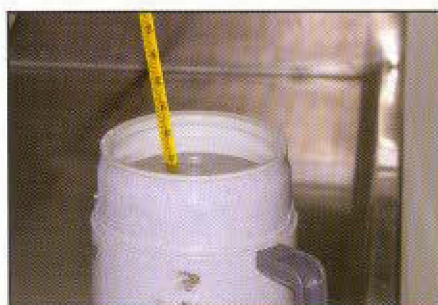
semen sexado en el cuerpo del útero versus media dosis cada cuerno, lo que hace esta práctica innecesaria y poco práctica.

ALGUNOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y REPRODUCTIVOS CON SEMEN SEXADO

Duración de la gestación. Se han realizado trabajos en los que se encontró que la duración de la gestación es similar para hembras procedentes de semen convencional que con semen sexado. Cuando se compara la duración de la gestación de machos y hembras, indiferente del tipo de semen utilizado, los machos tienen una duración de gestación 1.2 días mayor (278.4 para hembras vs. 279.6 para machos)²¹.

Peso al nacimiento. Los pesos al nacimiento de terneras producto de semen convencional y sexado son similares. La diferencia se encuentra, como es de esperar, en el sexo del ternero, los machos son significativamente más pesados. El peso del ternero al nacimiento se encuentra influenciado por otros factores como el peso de la madre, su número de partos, toro utilizado y el nivel nutricional del hato²¹.

Facilidad de parto. El índice de facilidad de parto en hembras nacidas de semen sexado es similar al de hembras nacidas por semen convencional. La diferencia significativa en las diferencias de facilidad de parto es dada por el sexo, ya que los machos al ser más pesados, pueden presentar mayor dificultad de parto²¹. Estudios realizados por la USDA, muestran una disminución en el índice de dificultad de parto de las vacas holstein, cuando se utiliza semen sexado. Esto es debido a que el índice es el producto del promedio de facilidad de parto entre machos y hembras. Al ser comparado con

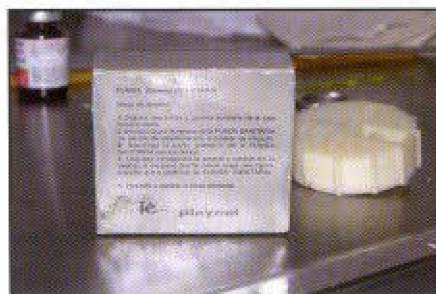


Termo descongelador de pajilla.

sólo hembras, su valor disminuye. Esta situación es opuesta a la presentada cuando se utiliza semen sexado macho, donde se incrementa la dificultad de parto.

Peso al destete. Los pesos al destete de terneras producto de semen sexado son similares a los de terneras producto de semen convencional²¹. La diferencia, al igual que en el peso al nacimiento, es la diferencia que hay entre machos y hembras, en la cual, el macho tiene mayor peso debido a mayor peso al nacimiento y a un anabolismo proteico superior.

Abortos. En 1.389 preñeces diagnosticadas para semen sexado y semen convencional, la tasa de abortos fue similar en ambos grupos. Tampoco se encontró en el semen convencional diferencia entre la proporción de abortos machos y hembras. El efecto de la finca, fue el que más influyó en la tasa de abortos en el estudio²¹. Tampoco se han reportado incremento en las anomalías anatómicas de los terneros, producto de semen sexado al nacimiento²¹.



Corta pajillas y fundas.

OTRAS APLICACIONES COMERCIALES DEL SEMEN SEXADO

Superovulación y transferencia de embriones convencional. Usualmente los programas de superovulación y transferencia de embriones han sido realizados con semen convencional. La alternativa de mayor aceptación para seleccionar el sexo de las crías ha sido mediante la biopsia embrionaria, en la cual se le extrae al embrión una(s) célula(s) para que a partir de ellas, ubicar sectores de su ADN relacionadas con cromosomas sexuales². La precisión de la prueba es muy alta, pero los costos de la micromanipulación y la identificación génica pueden ser altos. Adicionalmente la viabilidad del embrión sometido a biopsia disminuye notoriamente, con una baja en las tasas de preñez. Ante estas dificultades, se han realizado ensayos con semen sexado en programas de superovulación y transferencia de embriones para obtener una mayor proporción de crías del sexo deseado. Algunos estudios han mostrado bajas tasas de fertilización, y estas son atribuidas a disturbios endocrinos que puede generar la terapia de superovulación, que dan lugar a alteraciones en el transporte y la calidad de los oocitos, sumados a los efectos lesivos ocasionados en el espermatozoide por el proceso de sexaje. Adicionalmente, el proceso de sexaje también afecta el porcentaje de embriones viables, comparados con inseminaciones realizadas con semen convencional. (Tabla 4)¹³

Como se puede ver, el uso de semen sexado en programas de superovulación resultó en menor porcentaje de estructuras fertilizadas, menor cantidad de embriones viables y mayor porcentaje de embriones de generados por lavado.

Tabla 4. Resultados de embriones producidos mediante inseminación con semen sexado vs. semen convencional en programas de superovulación de novillas Holstein. Adaptado de Sartori et al. [13]

	Semen Sexado, 1 inseminación de 20 millones de espermatozoides (12 novillas)	Semen Sexado, 2 inseminaciones de 10 millones de espermatozoides (13 novillas)	Semen convencional, 2 inseminaciones de 10 millones de espermatozoides (14 novillas)
# Cuerpos lúteos al lavado	15.3 ± 1.7	18.1 ± 3.4	14.1 ± 1.5
Total estructuras colectadas por lavado	6.8 ± 1.6a	8.9 ± 1.8	9.9 ± 1.9b
Estructuras fertilizadas por lavado (%)	3.8 ± 0.8a 63.5%	4.9 ± 0.9a 61.9%	8.7 ± 1.7b 90.9%
Embriones viables por lavado (%)	1.9 ± 0.7a 24.3%	2.3 ± 0.6a 30.8%	6.3 ± 1.2b 71.3%
Embriones degenerados por lavado (%)	1.8 ± 0.4 (39.2%)	2.6 ± 0.6 (31.1%)	2.4 ± 0.9 (19.6%)

Otro estudio realizado por Shenk et al. mostró grandes diferencias en la cantidad de embriones transferibles en vacas y novillas angus en las que se utilizó semen sexado y convencional se encontraron en promedio 8.7 embriones transferibles con semen convencional y entre 3.3 y 4.1 embriones en semen sexado con 2 y 10 millones de espermatozoides por dosis, respectivamente¹⁵.

FERTILIZACIÓN IN VITRO

El hecho de que durante el proceso del sexaje de semen se disminuya la cantidad y la viabilidad de los espermatozoides, ha hecho pensar que una posibilidad interesante sea su utilización en programas de fertilización in vitro. Los estudios han mostrado resultados contradictorios. Algunos de ellos han demostrado que la tasa de fertilización de oocitos es similar para semen sexado y no sexado, mientras otros plantean que el porcentaje de oocitos obtenidos por punción ovárica que llegan al estado de 2 células y posteriormente a blastocistos, es inferior para el semen sexado, que pasó del 30-40% con semen congelado convencional al 10-20% de oocitos fertilizados con semen sexado^{2,22}.



Canastilla para almacenamiento de semen.



Equipo de inseminación artificial.

Respecto al desarrollo de los embriones producidos con semen sexado fue más lento. Se observó un atraso en el desarrollo de los embriones hasta el estado de blastocisto que tardó de medio hasta un día, comparado con embriones producidos con semen convencional¹¹. Morton et al.¹² encontraron que embriones provenientes de semen sexado poseen patrones alterados de expresión de su ARN mensajero, lo que se traduce en un desarrollo más lento de estos respecto a los embriones producidos con semen congelado convencional. El efecto del toro utilizado influye de manera notoria en el resultado de la fertilización².

Trabajos realizados por Fischer-Brown et al.⁶ mostraron que el 95% de los partos con la técnica in vitro, fueron hembras. De 285 transferencias hechas con un embrión, se llegó a 83 partos, lo que da una tasa de parición de 29.1%. Cuando utilizaron 2 embriones por transferencia en 176 receptoras transferidas, la tasa de parición se incrementó a 44.8%, sin embargo en las vacas transferidas con 2 embriones también se aumentaron las pérdidas fetales y se incrementó la incidencia de hidroalantoides, una condición que cursa con exceso de acumulación de líquidos en la placenta y que puede terminar en pérdida fetal.

Tanto la inseminación con semen sexado, como la producción in vivo e in vitro de embriones con semen sexado, tiene un enorme campo de acción en el objetivo de tener más

animales de genética superior con el sexo deseado en los hatos, pero se deben hacer mayores esfuerzos encaminados a mejorar la técnica de sexaje, minimizar el efecto lesivo

del sexaje sobre el espermatozoide, incrementar los índices de fertilidad y disminuir sus costos, con miras a lograr su masificación para beneficio de la producción animal².

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSSON, M. *et al.* pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. En: *Reprod Domest Anim.* Vol. 41 (2006); p. 95.
- CANTARELLI, L.; RHEINGANTZ, M. Y PALMA, G. Selección del sexo en mamíferos. En: *Bioteología de la reproducción*. 2 ed. Córdoba: Pluguiese siena, 2007. P. 415-445.
- CATT, S.L. *et al.* Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. En: *Reprod. Domest. Anim.* Vol.32 (1997); p. 251-258.
- DEJARNETTE, J.M. *et al.* Commercial application of sex-sorted semen in Holstein heifers. En: *J Anim Sci.* Vol.85 (2007); p. 228.
- DEN DAAS, J.H.G. *et al.* The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. En: *Journal Dairy Science.* Vol. 81 (1998); p. 1714-1723.
- FISCHER-BROWN, A. *et al.* Twin vs. single transfer of IVP Holstein embryos to beef recipients. En: *Reprod Fertil Dev.* Vol. 17 (2005); p. 230.
- GARNER, D.L. y SUH, T.K. Effect of Hoechst 33342 staining and laser illumination on viability of sex-sorted bovine sperm. En: *Theriogenology.* Vol. 57 (2002); p. 746.
- GARNER, D. L. Y SEIDEL JR. G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. En: *Theriogenology.* Vol. 69 (2008); p. 886-895.
- JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. En: *Animal Reproduction Science.* Vol. 60-61 (2000); p. 93-107.
- LIBBUS, B. L. *et al.* Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoechst 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. En: *Mutation Res.* Vol. 182 (1987); p. 265-274.
- LIU, K.H.; CRAN, D.G. and SEIDEL J.R., G.E. In vitro fertilization with flow-cytometrically sorted bovine sperm. En: *Theriogenology.* Vol. 52 (1999); p. 393-405.
- MORTON, KM. *et al.* Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. En: *Mol Reprod Dev.* Vol. 74 (2007); p. 931-940.
- SARTORI, R. *et al.* Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. En: *Anim. Reprod.* V. 1, no. 1, (2004); p. 86-90.
- SCHENK, J.L. y SEIDEL J.R., G.E. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of laser intensity, staining conditions, and catalase. En: *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64 (2007); p. 165-177.
- SCHENK, J.L.; SUH, T.K. y SEIDEL J.R., G.E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. En: *Theriogenology.* Vol. 20 (2006); p. 299-307.
- SEIDEL, J.R., G.E.; BRINK, Z. and SCHENK, J.L. Use of heterospermic insemination with fetal sex as the genetic marker to study fertility of sexed sperm. En: *Theriogenology.* Vol. 59 (2003); p. 515.
- SEIDEL, G.E. and GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. En: *Reproduction.* Vol. 124 (2002); p. 733-743.
- SEIDEL J.R., G.E. and SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. En: *Animal Reproduction Science.* Vol. 105 (2008); p. 129-138.
- SEIDEL J.R., G.E. *et al.* Insemination of heifers with sexed sperm. En: *Theriogenology.* Vol.52 (1999); p. 1407-1420.
- SUH, T.K.; SCHENK, J.L. and SEIDEL J.R., G.E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. En: *Theriogenology.* Vol. 64 (2005); p. 1035-1048.
- TUBMAN, L. *et al.* Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. En: *Journal Animal Science.* Vol. 82 (2004); p. 1029-1036.
- WHEELER, M.B. *et al.* Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. En: *Theriogenology.* Vol. 65 (2006); p. 219-227.
- HANSEN, G. Select the Sex of Your Next Calf Prior to Mating: Using Sexed Semen. En: <http://edis.ifas.ufl.edu/AN163>. Universidad de Florida.