

SEXAGEM DE SÊMEN

André Mariano BATISTA¹, Antonio Rodrigues da SILVA², Sildivane Valcácia SILVA³,
Maria Madalena Pessoa GUERRA^{4*}

RESUMO - Numerosos fatores têm sido associados à variação no número de nascimentos de machos e fêmeas dos mamíferos, como nutrição, estação do ano, doenças, concentração de gonadotropinas e hormônios esteróides, momento de inseminação, *status* social, estresse, idade e paridade. A possibilidade de influenciar no sexo do animal com o objetivo de produzir, preferencialmente, o nascimento de machos ou de fêmeas trará grande benefício econômico aos sistemas de criação, além de evitar o desaparecimento de animais ou raças ameaçadas de extinção, aumentando o seu número por meio da inseminação artificial (IA) com sêmen sexado. Objetivou-se com essa revisão abordar as principais técnicas utilizadas para separação de células espermáticas (X ou Y) e a viabilidade destes gametas em amostras de sêmen dos animais domésticos.

Termos para indexação: Separação, espermatozoides, sexo, animais domésticos.

SEMEN SORTING

ABSTRACT - Many factors have been associated to the variation on the rate of mammal male and female births, such as nutrition, season of the year, diseases, gonadotropin and steroid hormone concentrations, insemination moment, social status, stress, age and parity. The possibility of influencing in animal sex aiming to produce, preferentially, the birth of males or females will bring great economic benefit to producers of farm animals, besides avoiding the disappearance of animals and races threatened by extinction, increasing its numbers by artificial insemination (AI) with sexed semen. This paper had the objective to relate the main techniques used to sort sperm cells (X or Y) and the viability of these gametes in the samples of domestic animal semen.

Index terms: Sorting, spermatozoa, sex, domestic animals.

INTRODUÇÃO

A técnica de sexagem de espermatozoides tem sido estudada em procedimentos experimentais e aplicações relacionadas à saúde humana e produção de animais, visando promover a separação destes gametas com base nas suas diferenças e características. Um dos primeiros estudos de

pré-seleção sexual foi conduzido com base na separação de espermatozoides de coelhos e suínos por centrifugação. A seguir, várias pesquisas foram realizadas utilizando diferentes técnicas de pré-seleção. No final da década de 60, a utilização do citômetro de fluxo aumentou o interesse em mensurar o DNA das células através de muitas propostas, especialmente para o diagnóstico de câncer. Na reprodução, esse método foi utili-

¹ Mestrando, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Professor Adjunto, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Mato Grosso.

³ Doutoranda, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

⁴ Professor Associado, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. mpguerra@dmv.ufrpe.br. * **Autor para correspondência.**

zado para avaliar alterações espermiáticas associadas a danos genéticos (JOHNSON e WELCH, 1999).

Em 1979, Moruzzi deu especial atenção ao DNA, ao evidenciar diferenças entre os espermatozoides portadores de cromossomos X e Y. Em seguida, construiu-se o citômetro de fluxo com alta resolução, ortogonalmente configurado (PINKEL et al., 1982) e usado para mostrar a diferença de 3,2% no conteúdo de DNA do núcleo de espermatozoides de camundongos. O conhecimento adquirido no período de 1910 a 1981 contribuiu para o sucesso de outros trabalhos, em que o DNA foi considerado o único marcador eficaz de separação de espermatozoides (JOHNSON et al., 1989).

No entanto, alguns estudos avaliaram outros métodos para sexagem de sêmen, como o imunológico que necessita de equipamentos mais simples e menos caros, associado ao fato de relatos de que ao usar a técnica de citometria de fluxo, os corantes que se ligam ao DNA e são submetidos à excitação com feixe de laser, determinam efeitos negativos aos espermatozoides e, conseqüentemente, ao embrião (McNUTT e JOHNSON, 1996). Entretanto, pesquisas compararam a eficácia entre os métodos imunológicos e de citometria de fluxo, tendo sido constatado que, em virtude do método imunológico depender da expressão do gene pelos cromossomos X e Y, a sua eficiência é limitada (HENDRIKSEN, 1999).

A análise da cabeça dos espermatozoides por microinterferometria demonstrou que os espermatozoides X contêm mais DNA e proteína nuclear que os espermatozoides Y, sendo proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células (WINDSOR et al., 1993). Com base neste princípio, a técnica de Percoll, primeiramente descrita por Gorus e Pipeleers (1981), consistiu na centrifugação de espermatozoides em um gradiente de densidade contínuo, cujo princípio se baseou na diferença de massa entre as populações de espermatozoides X e Y.

Assim, desde então tem-se buscado uma técnica eficiente de separação

espermiática que, segundo Van Vleck (1981), possui os seguintes requisitos: 1) seja inofensiva às funções dos espermatozoides; 2) seja eficiente, com reduzido descarte ou perda de espermatozoides; 3) tenha acuidade próxima a 100%; 4) seja reprodutível; 5) seja simples e rápida; e 6) seja barata o suficiente para permitir sua difusão no mercado.

Nesta revisão teve-se como objetivo abordar as principais técnicas utilizadas para separação de células espermiáticas (X ou Y) e a viabilidade destes gametas em amostras de sêmen dos animais domésticos.

CITOMETRIA DE FLUXO

Os primeiros nascimentos de produtos com sêmen sexado através de citômetro de fluxo, com base no conteúdo de DNA dos espermatozoides, foram observados em coelhas cirurgicamente inseminadas no oviduto (JOHNSON et al., 1989). Desde então, foi constatada variação no conteúdo de DNA dos espermatozoides X e Y, com diferença de 2,8% no homem; 3,0% no coelho; 3,6% no suíno; 3,7% no garanhão; 3,8% no bovino; 3,9% no cão; e 4,2% nos ovinos (JOHNSON e WELCH, 1999), originando nascimentos de produtos com sexo pré-selecionado, os quais foram obtidos em suínos, bovinos, ovinos, humanos e eqüinos (BUCHANAN et al., 2000; O'BRIEN et al., 2003; HOLLINSHEAD et al., 2004; De GRAAF et al., 2007).

A IA em bovinos com baixas doses de sêmen sexado ($\sim 1 \times 10^6$ espermatozoides) foi considerada impraticável no início dos anos 90, uma vez que a taxa máxima de sexagem de espermatozoides X e Y era de, aproximadamente, 300.000 espermatozoides por hora. Todavia, a criação de máquinas mais modernas e de técnicas separadoras de células à alta velocidade (10×10^6 espermatozoides por hora) aumentou a possibilidade de sua utilização na IA (LU et al., 1999).

No entanto, como somente as células que passam alinhadas ao laser e ao detec-

tor podem ser mensuradas acuradamente e sexadas, foi desenvolvido o aparelho que orienta as células, altamente assimétricas, no ângulo correto, através do sistema de orientação de agulha (RENS et al., 1999). Esse sistema promoveu a separação de espermatozóides sob alta velocidade (JOHNSON e WELCH, 1999), com 85 a 90% de eficiência, produzindo mais de 11 milhões de espermatozóides X por hora, o que corresponde a 30 a 60 vezes a quantidade de células obtidas usando a tecnologia de separação de espermatozóides, inicialmente realizada em coelhos (JOHNSON e WELCH, 1999; JOHNSON et al., 1999). Além disso, estudos comprovaram que produtos oriundos de inseminação com sêmen sexado são morfológicamente normais e capazes de se reproduzir em sucessivas gerações (JOHNSON e PINKEL, 1986)

A partir daí, Seidel Jr. et al. (1999) relataram a inseminação de 1.000 novilhas com sêmen sexado através de citômetro de fluxo e corados com Hoechst 33342, e de 370 novilhas com sêmen não sexado e obtiveram taxa de prenhez com sêmen sexado e congelado (60,0%) semelhante àquela obtida com o sêmen não sexado e congelado (67,0%), que possuíam mais espermatozóides/dose inseminante. Da mesma forma, ao realizarem exame ultrasonográfico para diagnóstico de prenhez entre 30 a 60 dias pós-inseminação, foram constatadas perdas de prenhez similares para o grupo sexado (8,8 %) e controle (6,2%), evidenciando que os danos genéticos causados pela sexagem são mínimos.

Entretanto, vários estudos visaram aprimorar o uso desta técnica, tendo sido observado avanços na forma da ponteira do citômetro de fluxo, no posicionamento das células espermáticas no momento da passagem pelo laser, na pressão e no tipo de coloração das células, melhorando o processo de separação dos gametas X e Y. Além disso, constatou-se que existem diferenças relacionadas às características do cromossomo Y entre espermatozóides de raças distintas de bovinos, o que pode de-

terminar resultados variáveis na eficiência do processo de separação dos espermatozóides (X e Y), assim como nos resultados de prenhez após a utilização de sêmen sexado de raças taurinas e zebuínas (GARNER, 2006).

GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO

A centrifugação de amostras de sêmen, ricas em espermatozóides em gradientes de densidade crescentes, permitiu que as células de maior massa sedimentassem mais rápido, uma vez que o cromossomo sexual X contém maior quantidade de nucleoproteína do que o Y (SUMNER et al., 1976), determinando que os espermatozóides X, com maior massa, se localizem em maior número no sedimento, enquanto que os Y se encontrem no sobrenadante.

Shastry et al. (1977) observaram o inverso ao utilizar Ficoll como gradiente, onde relataram que dos espermatozóides encontrados no sedimento, 73-77% possuíam cromossomo sexual Y (corados pela quinacrina), enquanto 75-80% dos espermatozóides que permaneceram na interface possuíam cromossomo sexual X (não corados). Entretanto, utilizando os gradientes de Percoll, considerados de maior nível de resolução de densidade, estudos observaram que as células de maior massa (espermatozóides X) sedimentaram mais rapidamente (KANEKO et al., 1983; IIZUKA et al., 1987; SCHWIDERSKI et al., 1991), e que a quinacrina marcou como espermatozóides Y 73,0% das células localizadas na porção superior e 27,0% na porção inferior (KANEKO et al., 1983), ou apenas 6,4% dos espermatozóides do sedimento (IIZUKA et al., 1987).

Em bovinos, Schwiderski et al. (1991) utilizaram centrifugação em gradiente de Percoll para separar espermatozóides bovinos portadores do cromossomo X ou Y, onde encontraram que a suspensão de espermatozóides foi separada em quatro frações. A primeira e a última foram recuperadas, misturadas e colocadas novamente sobre o gradiente para serem centrifu-

gadas, nas mesmas condições. Este método propiciou enriquecimento de mais de 75% de espermatozoides X ou Y nas frações inferior e superior, respectivamente. Após as duas centrifugações, os espermatozoides de ambas as frações não demonstraram diferença significativa quanto a morfologia e presença de reação acrossômica. Além disso, estes autores relataram que as inseminações com espermatozoides da fração superior e inferior resultaram em 75% e 92% de embriões do sexo masculino e feminino, respectivamente.

Todavia, outros estudos utilizaram o processo de separação dos espermatozoides X ou Y de bovinos, em gradientes descontínuos de Percoll, onde constataram acuidade de, aproximadamente, 73,0% e que estes gametas foram capazes de fecundar 75,0% dos ovócitos, dos quais 30,0% se desenvolveram até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; Patentes FAPESP/UNESP, 2003, 2004a, 2004b).

VIABILIDADE DO USO DO SÊMEN SEXADO

Algumas pesquisas evidenciaram que espermatozoides sexados apresentam limitada aplicação à região de sua produção, necessitando, dessa forma, da realização do procedimento de criopreservação que viabilize a sua utilização a longa distância, visando maximizar a sua aplicação em outras biotécnicas da reprodução. No entanto, dependendo da técnica de separação espermática utilizada, a criopreservação de espermatozoides sexados requer modificação dos protocolos usados na indústria da IA, incluindo efeito de alta diluição; osmolaridade dos tampões; temperaturas de coloração e separação; efeitos da intensidade do laser; tempo de centrifugação e força g para concentrar espermatozoides sexados; diluente de congelação; taxa de refrigeração; intervalo entre refrigeração e criopreservação, e número mínimo de espermatozoides requerido para maximizar a taxa de prenhez (SCHENK et al., 1999).

Em bovinos, Schenk et al. (1999) e Seidel Jr. et al. (1999) demonstraram sucesso na técnica de congelação de espermatozoides sexados, bem como no nascimento de animais do sexo masculino ou feminino.

Todavia, existem relatos de redução dos índices de fertilidade com uso de sêmen sexado devido ao menor tempo de viabilidade destas células, associado a diferentes padrões de motilidade (SCHENK et al., 2006), que pode ser explicado pelo fato de espermatozoides separados por citometria de fluxo necessitarem de menor tempo para a sua capacitação (LU e SEIDEL Jr., 2004).

Por conseguinte, visando reduzir a variação no tempo de ovulação e melhorar a eficiência de programas de IA com sêmen sexado, tem-se utilizado técnicas de sincronização do estro nas fêmeas. No entanto, as taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte e de leite submetidas à sincronização do estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) têm sido pouco relatadas (SCHENK et al., 2006).

Em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*), Baruselli et al. (2007) relataram que não existem diferenças nas taxas de concepção quando a IATF com sêmen sexado ($2,1 \times 10^6$ espermatozoides/dose) é realizada 60 horas após a retirada do implante de progesterona, quando comparada ao uso do sêmen convencional, ratificando a hipótese de que a IATF próxima ao momento da ovulação aumenta a taxa de concepção do grupo de fêmeas inseminadas com sêmen sexado.

Em vacas de leite, Andersson et al. (2004) observaram taxas de prenhez de 21,0% para o grupo de vacas inseminadas com sêmen sexado e de 46,0% para o grupo inseminado com sêmen convencional. No entanto, apesar dos piores índices de prenhez, a utilização do sêmen sexado aumentou a quantidade de bezerras fêmeas nascidas (sexado = 83,0%; convencional = 49,0%).

Alguns autores argumentam que uma

das causas da reduzida taxa de concepção com uso do sêmen sexado é a pequena concentração de espermatozóides por dose (BARUSELLI et al., 2007). Assim, visando estudar o efeito da sexagem na viabilidade espermática, Bodmer et al. (2005) utilizaram a mesma concentração de espermatozóides por IA em vacas em lactação inseminadas 12 horas após a detecção de cio, onde observaram taxas de concepção (30-40 dias após IA) similares entre os grupos sexado (27,5%) e convencional (28,1%).

Schenk et al. (2006) estudaram o efeito do tipo de sêmen (sexado x convencional) e de diferentes doses de sêmen sexado na quantidade e qualidade de embriões produzidos de vacas e novilhas de corte e de novilhas de leite superovuladas. Nas vacas e novilhas de corte, estes autores observaram que o grupo que recebeu sêmen convencional apresentou significativamente maior porcentagem de ovócitos fertilizados (69,0%), quando comparada àquele que recebeu sêmen sexado com 10×10^6 espermatozóides/dose (49,0%) e com 20×10^6 espermatozóides/dose (40,0%). Além disso, o número de embriões transferíveis obtidos de novilhas de leite foi menor no grupo que recebeu sêmen sexado na dose de 20×10^6 espermatozóides/dose, quando comparado ao grupo que recebeu sêmen convencional na dose de 40×10^6 espermatozóides por dose. No entanto, a taxa de concepção foi similar para embriões originados dos grupos sexado (67,0%) e não sexado (63,0%).

Outro aspecto que pode interferir na viabilidade dos espermatozóides sexados é o local de deposição do sêmen, o qual foi estudado por Kurykin et al. (2007), onde observaram que as taxas de prenhez foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado (corpo uterino, corno uterino ou junção útero-tubárica) de novilhas de leite.

Com o objetivo de solucionar o problema decorrente do limitado número de espermatozóides sexados viáveis obtidos pelo uso do citômetro de fluxo, tem-se estuda-

do a sua associação à FIV ou injeção de espermatozóide no ovócito (LU et al., 1999). O primeiro relato de produção *in vitro* de bezerros com sêmen sexado foi realizado por Lu et al. (1988). Todavia, um subsequente trabalho usando espermatozóides Y possibilitou a transferência de 106 embriões, resultando no nascimento de 37 machos e 4 fêmeas, correspondendo a 90,0% de machos (CRAN et al., 1995).

De acordo com Amann (1999), os custos e os números adicionais de espermatozóides sexados pela citometria de fluxo são apropriados para uso na FIV. Entretanto, segundo este autor, muitos fatores podem interferir na taxa de blastocistos obtidos com sêmen sexado e criopreservado, uma vez que durante a preparação para sexagem, os espermatozóides estão sujeitos a condições que podem afetar os procedimentos de FIV, diferente das condições requeridas para fecundação *in vivo*.

Assim, apesar do fato de que na FIV menos espermatozóides sexados são necessários de que na IA, as células sexadas através do citômetro de fluxo são, provavelmente, pré-capacitadas, necessitando de modificações nos sistemas padrões de fertilização. Estudos mostraram que modificações na técnica de FIV promovem similares porcentagens de ovócitos fertilizados com sêmen congelado de bovino, sexado e não sexado, evidenciando que os ciclos celulares não sofrem alteração decorrente das células espermáticas terem sido submetidas ao procedimento de sexagem. Entretanto, em muitos casos, observou-se que a produção de blastocistos com sêmen sexado foi 70,0% daquele produzido com sêmen não sexado, demonstrando retardo no desenvolvimento dos blastocistos decorrente de alteração na função espermática, como capacitação, reação do acrossoma, ligação à zona e, conseqüentemente, desenvolvimento embrionário (LU et al., 1999).

Todavia, alguns autores relataram que amostras de sêmen submetidas ao processo de sexagem com 90,0% de acurácia têm resultado em embriões viáveis produzidos

pela FIV. Desta forma, o sucesso da utilização de sêmen sexado aumentará, consideravelmente, quando doses congeladas desse sêmen tornarem-se viáveis comercialmente (LU et al., 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a evolução de algumas técnicas de separação de espermatozoides X e Y permitiu avanços significativos. Contudo, nenhum método conseguiu reunir todas as condições necessárias para sua utilização prática. Aparentes diferenças entre espécies e raças dificultam avaliar quais fatores contribuem para alterar o número de nascimento de machos ou de fêmeas. Assim, diversos aspectos relacionados à técnica de sexagem de células espermáticas viáveis ainda necessitam ser elucidados, como redução dos custos associada ao aumento da produção destas células com alto poder fecundante, assim como a variação individual na fertilidade dos reprodutores doadores de sêmen para a sexagem. No entanto, a base científica e tecnológica da sexagem de espermatozoides tem evoluindo a cada ano, originando novas tecnologias que servirão para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes e acessíveis aos produtores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. Issues affecting commercialization of sexed sperm. **Theriogenology**, Stonehan, v. 52, p. 1441-1457, 1999.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOSKINEN, E. et al. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, Stonehan, v. 61, p. 1583-1588, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M. et al. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p. 374-381, 2007.
- BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M. et al. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, Stonehan, v. 64, p. 1647-1655, 2005.
- BUCHANAN, B.R.; SEIDEL JR, G.E.; McCUE, P.M. et al. Insemination of mares with low numbers of unsexed and sexed spermatozoa. **Theriogenology**, Stonehan, v. 53, p. 232-241, 2000.
- CRAN, D.G.; JOHNSON, L.A.; POLGE, C. Sex selection in cattle: a field trial. **Veterinary Record**, London, v. 136, p. 495-496, 1995.
- De GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L. et al. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 217 - 227, 2007.
- FAPESP/UNESP (Brasil). HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. F. P. D.-T. **Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado**. BR PI 0300604-2, 17 Jun. 2003.
- FAPESP/UNESP (Brasil). HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. F. P. D.-T. **Proceso de selección del sexo de espermatozoides mamíferos y método de control de calidad de dosis de sêmen sexado congelado**. AR P 040100475, 23 Fev. 2004a.
- FAPESP/UNESP (Brasil). HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. F. P. D.-T. **Process of sex selection of mammal spermatozoa and method to control quality of frozen sexed semen doses**. AT PCT/BR2004/000009, 11 Fev. 2004b.
- GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, Stonehan, v. 65, p. 943-957, 2006.
- GORUS, F.K.; PIPELEERS, D.G. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 35, p. 662-665, 1981.
- HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1295-1308, 1999.

- HOLLINSHEAD, F.K.; EVANS, G. EVANS, K. et al. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, p. 557-568, 2004.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; RAMALHO, M.D.T.; RODRIGUES, L.H. et al. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.
- IIZUKA, R.; KANEKO, S.; AOKI, R. et al. Sexing of human sperm by discontinuous percoll density gradient and its clinical application. **Human Reproduction**, Oxford, v. 7, p. 573-575, 1987.
- JOHNSON, L.A.; PINKEL, D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. **Cytometry**, New York, v. 7, p. 268-273, 1986.
- JOHNSON, L.A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1323-1341, 1999.
- JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; HAWK, H.W. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 41, p. 199-203, 1989.
- JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R.; RENS, W. The Beltsville sperm sexing technology: High-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77 (suppl 2), p. 213-220, 1999.
- KANEKO, S., YAMAGUCHI, S., KOBAYASHI, T. et al. Separation of X- and Y-bearing sperm using percoll density gradient centrifugation. **Fertility Sterility**, Birmingham, v. 40, p. 661-665, 1983.
- KURYKIN, J.; JAAKMA, Ü.; JALAKAS, M. et al. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 754-759, 2007.
- LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 819-830, 2004.
- LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1393-1405, 1999.
- LU, K.H.; GORDON, I.; CHEN, H.B. et al. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. **Veterinary Record**, London, v. 122, p. 539-540, 1988.
- McNUTT, T.L.; JOHNSON, L.A. Flow cytometric sorting of sperm: influence on fertilization and embryo/fetal development in the rabbit. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 43, p. 261-267, 1996.
- MORUZZI, J.F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, New York, v. 57, p. 319-323, 1979.
- O'BRIEN, J.K.; HOLLINSHEAD, F.K.; EVANS, K.M. et al. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 15, p. 367-375, 2003.
- PINKEL, D.; GLEDHILL, B.L.; VAN DILLA, M.A. et al. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. **Cytometry**, New York, v. 3, p. 1-9, 1982.
- RENS, W.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Improved flow cytometric sorting of X and Y chromosome bearing sperm: Substantial increase in yield of sexed semen. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 52, p. 5052, 1999.
- SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1375-11391, 1999.
- SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 299-307, 2006.
- SCHWIDERSKI, H.; BLOTTNER, S.; SCHWERIN, M. Mikroinjektion und "in vitro" befruchtung mit spermien aus versuchen zur anreicherung der geschlechtsspezifischen

- spermientypen beim rind. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 26, p. 143-144, 1991.
- SEIDEL JR., G.E.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A. et al. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, Stonehan, v. 52, p. 1407-1420, 1999.
- SHASTRY, P.R.; HEGDE, U.C.; RAO, S.S. Use of ficoll sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. **Nature**, London, v. 269, p. 58-60, 1977.
- SUMNER, A.T.; EVANS, H.J.; ROBINSON, J.A. A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, New York, v. 48, p. 9-15, 1976.
- VAN VLECK, L.D. Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning and selfing in dairy cattle. In: BRACKETT, B.G.; SEIDEL, G.E.; SEIDEL, S.M. (Eds). **New technologies in animal breeding**. New York: Academic Press, 1981. p. 221-242.
- WINDSOR, D.P.; EVANS, G.; WHITE, I.G. Sex predetermination by separation of X And Y chromosome-bearing sperm: A review. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 5, p. 155-171, 1993.