



Evolução da utilização de espermatozoides sexados

Evolution of sexed spermatozoa utilization

Vera F.M. Hossepian de Lima^{1,‡}, Ricardo Percin Nociti²

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

Resumo

A sexagem de espermatozoides tem relevante aplicação na produção animal. Várias publicações demonstram a eficiência do processo de sexagem por citometria de fluxo que separa os espermatozoides X e Y em função da mensuração do conteúdo de DNA. Importantes modificações no processo de sexagem por citometria de fluxo, tais como pressão, intensidade do laser, diluidores tem levado à diminuição dos danos nos espermatozoides e aumentado a viabilidade dos mesmos.

Palavras-chave: sêmen sexado, inseminação artificial, produção de embriões.

Abstract

Spermatozoa sexing has an important application for livestock production. Results have been published worldwide that demonstrate effectiveness of the flow cytometer sexing process based on sorting sperm with differential DNA content as the X and Y sperm marker. Major improvements in the sexing sorting process as pressure, laser power, extenders had led to the decrease of sperm damage and increase of sperm viability.

Keywords: sexed semen, artificial insemination, embryo production.

Introdução

Em espécies de interesse zootécnico, o desenvolvimento da sexagem de espermatozoides intensificou-se a partir da década de 80. Foi esse um processo diretamente ligado ao aprimoramento e à difusão das técnicas de reprodução assistida (Moore e Hasler, 2017).

Vários autores registraram, ao longo da década de 80 e seguintes, o valor econômico significativo da seleção de sexo na pecuária onde a produtividade é favorecida quando a progênie é constituída, em sua maioria, por um dos sexos (Holden e Butler, 2018).

Além do aspecto zootécnico, deve-se considerar a base científica da sexagem de espermatozoides que evolui rapidamente, originando conhecimentos que permitem desenvolver processos mais eficientes.

A evolução da sexagem de espermatozoides

Em 1983, Garner *et al.*, vislumbrando o desenvolvimento de uma metodologia comercial e automatizada para sexagem de espermatozoides, validaram a diferença citogenética que indicava que cromossomo X possuía cromátides maiores que o cromossomo Y.

Como a ideia era conseguir a automação da sexagem de espermatozoides, que são células achatadas, utilizando um citômetro de fluxo que naquela época era um equipamento utilizado apenas na versão para análise de células arredondadas, começaram por utilizá-lo para quantificar o DNA dos núcleos dos espermatozoides de várias espécies de animais para serem estabelecidas as diferenças na quantidade de DNA entre os espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y. As diferenças médias de 3,9%, 3,7%, 4,1% e 3,9% a mais de DNA nos núcleos contendo o cromossomo X para bovinos, caprinos, ovinos e coelhos, respectivamente, foram reportadas (Garner *et al.*, 1983).

No início foi difícil distinguir as pequenas diferenças do conteúdo de DNA entre as populações de espermatozoides X ou Y porque a intensidade do sinal de fluorescência era afetada devido às irregularidades da cromatina compactada, da morfologia da cabeça (achatada) e da orientação da cabeça dentro do citômetro. A intensidade de fluorescência do corante ligado ao DNA era maior na borda do que na face plana do espermatozoide porque a cromatina densa causava um alto índice de refração. A diferença do índice de refração entre a cabeça do espermatozoide e o meio de cultura circundante associados à forma achatada da cabeça do espermatozoide resultava em uma emissão de luz, preferencialmente, a partir da extremidade da cabeça do espermatozoide (Johnson e Pinkel, 1986).

Em 1986, foi anunciada a Beltsville Sperm Sexing Technology por Johnson e Pinkel que consistia na modificação do citômetro de fluxo convencional pela adaptação de um detector adicional de fluorescência colocado

[‡]Correspondência: vera.hossepian@unesp.br

Recebido: 29 de março de 2019

Aceito: 9 de abril de 2019



na frente e a 0° do laser de modo que o sinal de fluorescência fosse captado em outro ângulo além daquele de 90° do detector do aparelho original. Assim, o sinal fluorescente da face plana era captado pelo detector posicionado a 0° em relação ao laser e aquele emitido pela extremidade da cabeça era captado pelo posicionado a 90° em relação ao laser. Isto minimizava a heterogeneidade do sinal de fluorescência, permitindo a separação dos espermatozoides X ou Y. Outra modificação foi na agulha (tubo) do fluxo que passou a ter a forma de bisel o que permitia que apenas 20 a 40% dos espermatozoides fossem orientados corretamente em relação ao laser. Os espermatozoides orientados incorretamente, ou seja, com a face plana voltada para o detector de 90°, emitiam menos fluorescência para esse detector o que permitia que eles fossem retirados da análise eletronicamente. Apenas 350-400 mil espermatozoides eram sexados por hora (25-28 horas para produzir uma dose com 10 milhões de espermatozoides (Garner e Seidel, 2008).

Isso ocorria em função ao formato da agulha que orientava corretamente apenas 20 a 40% dos espermatozoides em relação ao feixe de laser (Garner e Seidel, 2008). A pequena quantidade de espermatozoides sexados por hora não permitia a subsequente congelação. Os espermatozoides eram resfriados e utilizados para inseminação cirúrgica, inseminação intrauterina profunda (Cran *et al.*, 1995; Seidel *et al.*, 1997) ou produção de embriões *in vitro* (Cran *et al.*, 1993). Nessas tentativas, as taxas de prenhez na inseminação artificial (IA) e na produção *in vitro* de embriões PIVE chegavam a ser 10% e 20% menores que aquelas conseguidas com sêmen convencional (Garner e Seidel, 2008).

A agulha em formato de bisel foi substituída por bocal de forma elíptica, aumentando para 70% a porcentagem de espermatozoides corretamente orientados em relação ao laser (Rens *et al.*, 1998). Essa melhor orientação deveu-se ao fato do formato elíptico exercer e manter uma força hidrodinâmica nos espermatozoides até eles se posicionarem na frente do laser, diminuindo a chance deles mudarem a orientação correta. Essa modificação foi refinada pela XY, Inc. (Fort Collins, Colorado) e denominada CytoNozzle™ que fazia parte do equipamento MoFlo® SX Sex Selection Sperm Sorter (comercializado pela Cytomation) que por sua vez produz 15 milhões de espermatozoides por hora com pureza acima de 85% devido a um aumento da pressão imposta aos espermatozoides para passarem através do tubo elíptico (Johnson e Welch, 1999; Garner e Seidel, 2008).

Basicamente, para a sexagem, o ejaculado é fracionado e os espermatozoides incubados em corante fluorescente com afinidade para DNA (Hoeschst 33342) por cerca de 1 hora (Seidel, 2007). Este corante liga-se a dupla hélice evidenciando as diferenças de conteúdo de DNA entre os espermatozoides X ou Y. Os espermatozoides X ou Y são colocados no citômetro de fluxo e passam em fila única através de um tubo elíptico. No fim do trajeto os espermatozoides saem individualizados em gotas (devido à vibração durante o trajeto) e sobre elas incide um feixe de laser que evidencia a fluorescência. Os sinais fluorescentes emitidos pelo núcleo dos espermatozoides são coletados, simultaneamente, por detectores ópticos posicionados a 0° e 90° em relação a face plana e extremidades da cabeça, respectivamente. Os detectores convertem estes sinais para sinais elétricos que carregam positivamente e negativamente as gotas contendo o espermatozoide X ou Y, respectivamente, de acordo com a intensidade de fluorescência. As gotas passam por um campo eletrostático e são coletados em dois tubos distintos de acordo com a carga elétrica. Esses tubos contêm tampões apropriados para manter a viabilidade espermática e preparar as células para o resfriamento. As gotas vazias e aquelas que não estão dentro dos padrões de fluorescência estabelecidos (que contêm mais que um espermatozoide) continuam no feixe central e caem em um tubo para descarte (Seidel, 2007).

Os processos de resfriamento, congelação, e controle de qualidade seguem os padrões semelhantes ao sêmen convencional com as modificações necessárias para atenuar os possíveis danos que as várias etapas do processo podem causar (Garner e Seidel, 2008).

Após as modificações e refinamentos que originaram o MoFlo® SX Sex Selection Sperm Sorter, e ajustes na congelação (Garner e Seidel, 2008) iniciou-se a produção comercial de doses de sêmen congelado sexado bovino o que gerou uma série de publicações que nortearam a utilização e uma nova etapa de aperfeiçoamento do processo, como descrito a seguir.

Utilizando-se espermatozoides sexados para inseminação artificial em bovinos, a diminuição das taxas de concepção (Baruselli *et al.*, 2007; Borchersen e Peacock, 2009; Norman *et al.*, 2010; Healy *et al.*, 2013; Naniwa *et al.*, 2019) e de prenhez (Bodmer *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2006; Seidel e Schenck, 2008; Schenk *et al.*, 2009; Underwood *et al.*, 2010) variam, em média, entre 10 a 25 % quando comparado com o sêmen convencional. DeJarnette *et al.* (2011) relataram uma redução de 16% na taxa de concepção após a inseminação artificial com doses de 10 milhões de espermatozoides sexados quando comparado com o sêmen convencional com a mesma concentração.

Na inseminação artificial com tempo fixo em bovinos, Baruselli *et al.*, (2007) relataram resultados semelhantes ao sêmen convencional enquanto Sales *et al.* (2011), Ingenhoff *et al.* (2017) e Noonan *et al.*, (2016) cerca de 20% a menos de taxa de prenhez e de concepção.

Sá Filho *et al.* (2013) encontraram uma variação na taxa de prenhez entre 11,6 a 46,1% em função do touro utilizado na IATF com espermatozoides sexados. As pesquisas continuam no sentido de ajustar protocolos e a escolha de touros para melhorar taxas de fertilidade após a utilização de espermatozoides sexados na IATF (Pellegrino *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018).

Na produção *in vivo* de embriões bovinos observou-se redução de cerca de 50% de diminuição nos oócitos fecundados e 30% no número de embriões viáveis em relação ao sêmen convencional provavelmente devido ao menor número de espermatozoides por dose de sêmen sexado (Baruselli *et al.*, 2007; Larson *et al.*, 2010). As taxas



de prenhez após a transferência de embriões produzidos com espermatozoides sexados e não sexados em função do aumento do número de espermatozoides por dose de sêmen (Schenk *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2009).

An *et al.* (2010) demonstraram que a taxa de prenhez após a inseminação artificial intracornual com espermatozoides sexados foi semelhante à do sêmen convencional depositado no corpo do útero ou no corno uterino. Também Soares *et al.* (2011) relataram produção de embriões cerca de 50% menor em relação ao sêmen convencional em doadoras que foram inseminadas 12 e 24 horas com espermatozoides sexados, sendo que quando os horários da inseminação artificial foram 18 e 30 horas a produção de embriões não diferiu estatisticamente.

Na produção *in vitro* de embriões, inicialmente as taxas de blastocisto eram significativamente menores (Zhang *et al.*, 2003; Lu e Seidel, 2004; Puglisi *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2006). De maneira contrastante, Carvalho *et al.*, 2010 não encontraram diferença significativa na cinética espermática e taxa de blastocistos quando compararam espermatozoides sexados com não sexados.

Lopez *et al.* (2015), em bovinos, demonstraram que a taxa de blastocisto também pode ser influenciada pela subespécie da fêmea doadora de oócitos.

Apesar da diminuição significativa na taxa de prenhez (cerca de 12%) após a transferência de embriões produzidos com espermatozoides sexados (Xu *et al.*, 2009; Mikkola *et al.*, 2015), em média, a taxa de nascimento pode ser semelhante aquela conseguida com embriões produzidos com sêmen convencional (Rasmussen *et al.* 2013).

No início da utilização da tecnologia foi reportado que espermatozoides sexados, associado à técnicas de reprodução assistida diminuía a fertilidade, em média de 20 a 30% (Schenk *et al.*, 2009; Norman *et al.*, 2010) e foi a principal razão da tecnologia não ter sido amplamente difundida (Seidel, 2014). Essa diminuição era resultado dos danos sofridos pelos espermatozoides nas várias etapas do processo de sexagem que promoviam alterações na integridade de membrana e na motilidade (Suh *et al.*, 2005), na fragmentação do DNA e redução da longevidade (Gosálvez, *et al.*, 2011) e a capacitação (Bucci *et al.*, 2012).

Concomitante à utilização no campo e os estudos da viabilidade espermática *in vitro*, ajustes eram feitos no processo de sexagem no que se referia à pressão (Suh *et al.*, 2005; Schenk *et al.*, 2009), concentração do corante (Lu e Seidel, 2004), potência do laser (Guthrie *et al.*, 2002), número de espermatozoides por dose de sêmen (Schenk *et al.*, 2009) e protocolos de congelamento (Schenk *et al.*, 2009). O local de deposição do sêmen na inseminação artificial (Seidel e Schenk, 2008; Chang *et al.*, 2017), o efeito do touro (Sá Filho *et al.*, 2013) também foram avaliados.

Na tentativa de elucidar os possíveis danos às estruturas espermáticas e ao genoma durante o processo de sexagem, que se traduziam pela diminuição nas taxas de fertilidade, as investigações também avançaram para o campo celular e molecular.

Demonstrou-se que os embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado apresentavam uma alta proporção de mitocôndrias imaturas e membranas nucleares danificadas (Palma *et al.*, 2008) e expressão reduzida de genes importantes para o desenvolvimento embrionário e placentação (Morton *et al.*, 2007; Bermejo-Álvarez, *et al.*, 2010). Essas diferenças explicariam as altas taxas de perda embrionária nos períodos de 30 a 90 dias de gestação após a inseminação artificial (Bodmer *et al.*, 2005; Underwood *et al.*, 2010).

Como reflexo, além das modificações no processo de sexagem, surgiram os relatos que demonstram que os resultados de taxa de prenhez variam em função da fertilidade e manejo das fêmeas, categorias de fêmeas a serem utilizadas para inseminação (Rhinehart *et al.*, 2011; Healy *et al.*, 2013; Karakaya *et al.*, 2014; Naniwa *et al.*, 2019) e da fertilidade dos touros doadores de sêmen (De Jarnette *et al.*, 2011; Sales *et al.*, 2011). O efeito do touro (Lu e Seidel, 2004; Wheeler *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009; Sá Filho *et al.*, 2013), do protocolo de PIVE (Blondin *et al.*, 2009; Barceló-Fimbres, 2011; Missio *et al.*, 2018; Naniwa *et al.*, 2019) e a intensidade de pressão do citômetro (Barceló -Fimbres, 2011) podem ser responsáveis pela diminuição das taxas de blastocisto.

Os danos no DNA e alterações na expressão gênica, apontados como a causa da menor fertilidade, aparentemente foram eliminados com as modificações do processo de sexagem. Assim, Pozzi *et al.* (2014) concluíram que a coloração com Hoechst 33342 e ao laser durante a sexagem não alteraram significativamente a estrutura do DNA dos espermatozoides e dos embriões produzidos com os mesmos. Nociti *et al.*, 2018 não encontraram diferença na expressão gênica entre blastocistos produzidos com espermatozoides sexados (X e Y) (XY Technology Inc.) sêmen sexado e convencional.

Os benefícios que a utilização da sexagem por citometria de fluxo promove em rebanhos bovinos e diferentes sistemas de produção fez com que ela se consolidasse e dificilmente será substituída num futuro próximo (Seidel, 2014; Holden e Butler, 2018). Assim, a tecnologia XY (Johnson e Welch, 1999; Garner e Seidel, 2008) foi modificada originando a tecnologia SexedULTRA™ (Navasota, TX, USA) que promoveu modificações (pH, carga oxidativa, poder tampão) que possibilitam a proteção dos espermatozoides durante o processo de sexagem (González-Marin *et al.*, 2018). Assim, a comparação das tecnologias SexedULTRA™ e XY após a descongelamento dos espermatozoides sexados demonstrou que a fragmentação de DNA foi menor na primeira. Também, a motilidade progressiva e longevidade às 0h (50.7 v. 44.9%) e 3h (31.5 v. 4.4%), a integridade de acrossoma (78.0 v. 64.0%), a taxa de blastocistos grau 1 e 2 (13.2% v.9.2%) foram significativamente maiores do que aquelas de espermatozoides sexados pela tecnologia XY Inc. (González-Marin *et al.*, 2018; Vishwanath e Moreno, 2018).

Conforme revisado por Vishwanath e Moreno (2018), a taxa de concepção (cerca de 7%) após a inseminação artificial aumentou significativamente em relação à metodologia anterior.



Na inseminação artificial com tempo fixo os resultados iniciais demonstram taxa de prenhez menor (8%) que sêmen convencional (Marques *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2017), aumento significativo na taxa de prenhez (9%) em comparação a metodologia anterior (Marques *et al.*, 2018) e taxa de concepção semelhante ao sêmen convencional (Crites *et al.*, 2018). Entretanto, os resultados variaram em função do touro (Thomas *et al.*, 2019).

O impacto das tecnologias da reprodução nos sistemas de produção depende de quão amplamente e eficientemente possam ser implementadas (Moore e Hasler, 2017).

No caso do sêmen sexado o aumento da utilização é função da interação entre o mercado (preços e custos), práticas de manejo e eficiência tecnológica em termos de acuidade e fertilidade (McCulloch *et al.*, 2013). Assim, a sua utilização em novilhas aumentou de 9,4% (2007) para 30,7% (2015) e, em vacas, de 0,2% para 1% no mesmo período (Hutchison e Bickhart, 2016) coincidindo com as modificações no processo que levaram ao aumento da fertilidade (Vishwanath e Moreno, 2018).

Estima-se que produção de sêmen sexado de alta fertilidade acelerará a sua ampla utilização nos rebanhos promovendo a maximização do progresso genético, além de minimizar as perdas, melhorar o bem-estar animal e aumentar a lucratividade nos sistemas de produção (Holden e Butler, 2018).

Referências

- An L, Wu Z-H, Wu Y-F, Zhang X-L, Liu X, Zhu Y-B, Cheng W-M, Gao H-M, Guo M, Tian J-H. Fertility in Single-ovulating and Superovulated Dairy Heifers after Insemination with Low Dose Sex-sorted Sperm. *Reprod Dom Anim*, v.45, p.344-350, 2010.
- Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reprod Dom Anim*, n.41, p. 95-97, 2006.
- Barceló-Fimbres M, Campos-Chillón LF, Seidel GE Jr. In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod Domest Anim*, v.46, n.3, p.495-502, 2011.
- Baruselli PS, Souza AH, Martins CM, Gimenes LU, Sales JNS, Ayres H, Andrade AFC, Raphael CF, Arruda RP. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, n.3 p.374-381, 2007.
- Bermejo-Álvarez P, Lonergan P, Rath D, Gutiérrez-Ádan A, Rizos D. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.426-436, 2010.
- Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, v.71, p.30-38, 2009.
- Bodmer M, Janett F, Hässig M, den Daas N, Reichert P, Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1647-1655, 2005.
- Borchersen, S, Peacock, M. Danish AI field data with sexed semen. *Theriogenology*, v.71, p.59-63, 2009.
- Bucci D, Galeati G, Tamanini C, Vallorani C, Rodriguez-Gil JEE, Spinaci M. Effect of sex-sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.77, p.1206-1216, 2012.
- Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourão GB, Dode MAN. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, v. 74, p.1521-1530, 2010.
- Chang LB, Chou C-J, Shiu J-S, Tu P-A, Gao S-X, Peng S-Y, Wu S-C. Artificial insemination of Holstein heifers with sex-sorted semen during the hot season in a subtropical region. *Trop Anim Health Prod*, v.49, p.1157-1162, 2017.
- Cran DG, Johnson L A, Miller NG, Cochrane D, Polge C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. *Vet Rec*, v.132, p.40-41, 1993.
- Cran DG, Johnson LA, Polge C. Sex preselection in cattle: a field trial. *Vet Rec*, v.136, p.495-496, 1995.
- Crites BR, Vishwanath R, Arnett AM, Bridges PJ, Burris WR, McLeod KR, Anderson LH. Conception risk of beef cattle after fixed-time artificial insemination using either SexedUltra™ 4M sex-sorted semen or conventional semen. *Theriogenology*, v.15, n.118, p.126-129, 2018.
- DeJarnette JM, Leach MA, Nebel RL, Marshall CE, Cleary CR and Moreno JF. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers; is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *J Dairy Sci*, v.94, n.3477-3483, 2011.
- Garner DL, Gledhill L, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, Johnson LA. Quantification of the X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod*, v.28, p.312-321, 1983.
- Garner DL, Seidel GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, v.69, p.886-895, 2008.
- Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME, Moreno JF. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology*, v.75, n.2, p.206-211, 2011.



- González-Marín C, Góngora CE, Gilligan TB, Evans KM, Moreno JF, Vishwanath, R.** In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.114, p.40-45, 2018.
- Guthrie HD, Johnson LA, Garret WM, Welch GR, Dobrinsky JR.** Flow cytometric sperm sorting: Effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol Reprod Dev*, v.61, n.1, p.87-92, 2002.
- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y.** Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.68-73, 2009.
- Healy AA, House JK, Thonson PC.** Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *J. Dairy Sci*, v.96, p.1905-1914, 2013.
- Holden AS, Butler ST.** Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal*, v.12, n.1, p.97-103, 2018.
- Hutchison JL, Bickhart DM.** Sexed-semen usage for Holstein AI in the United States. *J Anim Sci*, v.94(E-Suppl. 5), p.176, 2016. Abstract.
- Ingenhoff L, Hall E, Ranjbar SNI, House JK.** Effect of insemination site and diameter of the pre-ovulatory follicle on the odds of pregnancy in heifers using sexed or non-sexed semen. *Austr Vet J*, v.95, n.9, 2017.
- Johnson LA, Pinkel D.** Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry*, v.7, p.268-273, 1986.
- Johnson LA, Welch GR.** Sex selection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, v.52, p.1323-1342, 1999.
- Karakaya E, Yilmazbas-Mecitoglu G, Keskin A, Alkan A, Tasdemir U, Santos JEP, Gumen A.** Fertility in dairy cows after artificial insemination using sex-sorted sperm or conventional semen. *Reprod Dom Anim*, v.49, n.2, p.333-337, 2014.
- Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC.** Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.73, n.5, p.698-703, 2010.
- Lopez WO, Alvis-Miranda HR, Gamarra AF, Rendon B, Borda DA, Albicker U, Fonoff ET, Martinez-Diaz M.** Effects of sexed semen and interactive effects on commercial in vitro embryo production when oocytes are collected from cows of *Bos indicus*, and *Bos taurus* breeding and crossbred cows of these subspecies. *Anim Reprod Sci*, v.156, p.58-63, 2015.
- Lu, KH, Seidel, GE.** Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*, v.62, p.819-30, 2004.
- McCulloch K, Hoag DLK, Parsons J, Lacy M, Seidel GE, Wailes W.** Factors affecting economics of using sexed semen in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, v.96, p.6366-6377, 2013.
- Marques MO, Morotti F, Lorenzetti E, Bizarro-Silva C, Seneda MM.** Intensified use of TAI and sexed semen on commercial farms. *Anim Reprod*, v.15, n.3, p.197-203, 2018.
- Mikkola M, Andersson M, Taponen J.** Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. *Theriogenology*, v.84, p.1118-1122, 2015.
- Missio D, Folchini NP, Leivas FG, Pavin CIUM, Pinto HF, Cibin FWS, Brum DDS.** Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. *Anim Reprod Sci*, v.192, p.146-153, 2018.
- Moore SG, Hasler JF.** A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J Dairy Sci*, v.100, p.10314-10331, 2017.
- Morton KM, Herrmann D, Sieg B, Struckmann C, Maxwell WMC, Rath D, Evans G, Lucas-Hahn A, Niemann H, Wrenzycki C.** Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-citometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.931-40, 2007.
- Naniwa Y, Sakamoto Y, Toda S, Uchiyama K.** Bovine sperm sex-selection technology in Japan. *Rep Med Biol*, v.18, p.17-26, 2019.
- Nociti, RP.** *Transcriptoma de embriões bovinos produzidos in vitro com espermatozoides sexados por citometria de fluxo*. 2018. p 110. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018.
- Noonan EJ, Kelly JC, Beggs DS.** Factors associated with fertility of nulliparous dairy heifers following a 10-day fixed-time artificial insemination program with sex-sorted and conventional semen. *Austr Vet J*, v.94, n.5, p.145-148, 2016.
- Norman HD, Hutchison JL, Miller RH.** Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *J Dairy Sci*, v.93, p.3880-3890, 2010.
- Palma GA, Olivier NS, Neumüller CH, Sinowatz, F.** Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Anat Histol Emb*, v.37, p.67-73, 2008.
- Pellegrino CAG, Morotti F, Untura RM, Pontes JHF, Pellegrino MFO, Campolina JP, Seneda MM, Barbosa FA, Henry M.** Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of *in vitro*-produced embryos in cattle. *Theriogenology*, v.86, p.888-893, 2016.
- Pozzi A, Previtali C, Lukaj A, Galli A, Bongioni G, Puglisi R.** High-resolution melt analysis does not reveal mutagenic risk in sexed sperm and *in vitro*-derived bovine embryos *Anim Genet*, v.45, p.473-478, 2014.



- Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi D, Parati K, Bongioni G, Crotti G, Galli C, Lazzari G, Alendri R.** *In vitro* fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction*, v.132, p.519-526, 2006.
- Rasmussen S, Block J, Seidel GE, Brink Z, McSweeney K, Farin PW, Bonilla L, Hansen PJ.** Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology*, v.79, n.3, p.453-461, 2013.
- Rens W, Welch GR, Johnson LA.** A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome-bearing sperm. *Cytometry*, v.33, n.4, p.476-481, 1998.
- Rhinehart JD, Arnett AM, Anderson LH, Whittier WD.** Conception rates of sex-sorted semen in beef heifers and cows. *J Anim Sci*, v.89, s.2, 2011.
- Sá Filho MF, Penteadó L, Reis EL, Reis TANPS, Galvão KN, Baruselli PS.** Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. *Theriogenology*, v.79, p.625-632, 2013.
- Sales JNS, Neves KAL, Souza AH, Crepaldi GA, Sala RV, Fosado M, Campos-Filho EP, de Faria M, Sá Filho MF, Baruselli PS.** Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, v.76, n.3, p.427-435, 2011.
- Schenk JL, Cran DG, Everett RW, Seidel GE.** Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*, v.71, p.717-728, 2009.
- Schenk JL, Suh TK, Seidel GE.** Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, v.65, n.2, p.299-307, 2006.
- Seidel GE.** Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, v.68, p.443-446, 2007.
- Seidel GE.** Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, v.8, s.1, p.160-164, 2014.
- Seidel, GE, Allen, CH, Johnson, LA, Holland, MD, Brink, Z, Welch, GR, Graham, JK, Cattell, MB.** Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of non-frozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.1255-1265, 1997.
- Seidel GE, Schenk JL.** Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.129-138, 2008.
- Silva MAV, Santos CS, França IG, Pereira HG, Sá Filho MF, Freitas BG, Guerreiro BM, Faquim A, Baruselli PS, Torres-Júnior JRS.** Hormonal strategy to reduce suckled beef cow handling for timed artificial insemination with sex-sorted semen. *Theriogenology*, v.114, p.159-164, 2018.
- Soares JG, Martins CM, Carvalho NA, Nicacio AC, Abreu-Silva AL, Campos Filho EP, Torres Júnior JR, Sá Filho MF, Baruselli PS.** Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors. *Anim Reprod Sci*, v.127, n.3-4, p.148-53, 2011.
- Suh TK, Schenk JL, Seidel GE.** High pressure flowcytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, v.64, p.1035-1048, 2005.
- Thomas JM, Locke JWC, Bonacker RC, Knickmeyer ER, Wilson DJ, Vishwanath R, Arnett AM, Smith MF, Patterson DJ.** Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex-sorted semen in timed artificial insemination programs for mature beef cows. *Theriogenology*, v.1, n.123, p.100-107, 2019.
- Thomas JM, Locke JWC, Vishwanath R, Hall JB, Ellersieck MR, Smith MF, Patterson, DJ.** Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*, v.98, p.88-93, 2017.
- Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WMC, Evans G.** Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.7-12, 2010.
- Vishwanath R, Moreno JF.** Review: semen sexing—current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal*, v.12, n.1, p.85-96, 2018.
- Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe DJ.** Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology*, v.65, n.1, p.219-227, 2006.
- Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, Rutledge JJ, Penfield CMS, Weigel KA.** *In vitro* production of bovine embryos using sex sorted sperm. *Theriogenology*, v.65, p.1007-1015, 2006.
- Xu J, Chaubal SA, Du F.** Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.39-47, 2009.
- Zhang M, Lu KH, Seidel GE.** Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*, v.60, p.1657-1663, 2003.
-