

USO DE SÊMEN SEXADO EM BOVINOS

USE OF SEXED SEMEN IN CATTLE

MURTA, Danillo Velloso Ferreira.

Medico Veterinário, Docente FUNORTE/MG, Doutorando em Medicina Veterinária
UFV.

danillo.murta.vet@gmail.com

GOMES, Viviane Cristine Leite.

Graduanda em Medicina Veterinária UFMG

MARTINEZ, Lorena Catalina Rodriguez.

Medica Veterinária Universidad del Tolima, Mestranda Medicina Veterinária UFV.



RESUMO

O sexo dos bezerros nascidos em qualquer sistema de produção da pecuária é um fator que afeta diretamente a lucratividade do rebanho. Assim, o desenvolvimento de técnicas que permitam a seleção do sexo por sexagem de sêmen ou de embriões pré-implantados representa um avanço, já que possibilita maior ganho genético, eficiência produtiva, maior flexibilidade de manejo e a preservação de fêmeas ou machos de acordo com a demanda. Esta revisão teve o objetivo de descrever o processo de sexagem de sêmen e sua aplicação associada a inseminação artificial de bovinos e a outras biotecnologias.

Palavras-chave: Sexagem; inseminação, sêmen.

ABSTRACT

The sex of the calves born in any livestock production system is a factor that directly affects the profitability of the herd. Thus, the development of techniques for sex selection for sexing semen or pre-implanted embryos represents an advance because it allows greater genetic gain, production efficiency, greater flexibility of management and preservation of females or males according to demand. This review aimed to describe the process of sexing of semen and its associated application insemination of cattle and other biotechnologies.

Key Word: sexing; insemination; semen

INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção da pecuária o sexo dos bezerros nascidos é um fator importante para o desempenho econômico. Para bovinos de leite verifica-se maior valor zootécnico das bezerras, portanto a gestação e nascimento de uma cria do sexo masculino representam como fatores que reduzem a produtividade e aumento dos custos de produção (HOSSEPIAN DE LIMA, 2006; BARUSELLI et al, 2007). Nos sistemas cuja finalidade é a exploração da pecuária de corte o interesse dos bezerros machos é maior devido seu potencial de produção, como por exemplo em cruzamento industrial no qual estes animais apresentarem maior rendimento de carcaça que as fêmeas (RUVUNA et al, 1991). Outro fator é que o número de crias é inversamente



proporcional à conversão alimentar, desta forma a redução do ciclo dos animais potencializa a produção de carne, podendo obter maior eficiência induzindo a produção de bezerras fêmeas para reposição, com sêmen ou embrião sexado (TAYLOR, 1986; HOHENBOKEN, 1999).

Desta forma, há estudos voltados a predizer e manipular o sexo dos bezerros. Em mamíferos, a seleção do sexo pode ser feita por sexagem de sêmen e de embriões pré-implantado. A sexagem de espermatozóides permite maximizar a produção animal, possibilitando maior progresso genético entre as gerações (HOSSEPIAN DE LIMA, 2006). Apenas 5% das fêmeas bovinas aptas a reprodução são inseminadas no Brasil (ASBIA, 2005), porém esta taxa está em crescimento, verificando-se aumento de 350% na última década, o que representa comércio de 7 milhões de dose de sêmen/ano (ASBIA, 2005), e permite o desenvolvimento desta nova tecnologia.

Atualmente as técnicas de sexagem de sêmen são caras, sofisticadas e podem causar danos irreparáveis aos espermatozóides e seu DNA, podendo reduzir a fertilidade e produção de embriões viáveis (HOSSEPIAN DE LIMA, 2006). Segundo DEMATAWEWA & BERGER (1998) o custo por unidade de sêmen sexado varia de US\$ 19-35,00.

Objetivou-se com esta revisão descrever a respeito do processo de sexagem de sêmen e sua utilização em rebanhos bovinos associados a biotecnologias, tais como inseminação artificial, superovulação e fecundação *in vitro*.

DESENVOLVIMENTO

Métodos de sexagem

A separação dos espermatozóides portadores do cromossomo X daqueles portadores do cromossomo Y baseia-se na detecção de pelo menos uma das seguintes diferenças fenotípicas entre esses dois tipos de célula, tais como a sensibilidade ao pH, a carga elétrica da superfície da membrana, a morfologia do núcleo e cabeça, os antígenos de superfície, a velocidade de migração, o conteúdo de DNA e as diferenças na densidade (MOTA, 2004).

A partir das décadas de 70 e 80 ocorreram avanços na tecnologia de sexagem de sêmen como o sistema de marcação com fluorcromo que se liga a célula e emite sinais



fluorescentes captados e as separa de acordo com a intensidade de fluorescência (VAN DILLA et al, 1977).

GLEDHILL et al (1982) verificaram que a técnica de citometria de fluxo permitiu a separação de células com cromossomos X e Y, em ratos geneticamente anormais (induzidos) e ratos normais, de acordo com diferentes níveis de DNA. Este método foi utilizado a partir de então com sêmen de animais domésticos, sendo descrita esta diferença de DNA em touros de 3,9%, em varrões de 3,7%, em carneiros de 4% e em coelhos de 3,9% (GARNER et al, 1983). Estas diferenças do conteúdo do DNA foram verificadas pelo fato dos espermatozóides que contém o cromossomo X apresentarem maior quantidade de material genético que aqueles compostos pelo cromossomo Y (GARNER et al, 2006).

A citometria de fluxo associa-se à emissão de raios laser, coloração diferencial dos espermatozóides viáveis e as forças hidrodinâmicas que direcionam os espermatozóides durante a separação (GARNER et al, 2006). A sexagem dos espermatozóides no citômetro de fluxo baseia-se na intensidade de fluorescência após a adição de um corante florescente. Esta técnica permite a separação de 100 células/segundo, permitindo então que em 5-6 horas obtenha-se 2×10^6 espermatozóides, tendo uma acurácia de 90% (JOHNSON, 1994). Como forma de potencializar os resultados, um novo sistema orientado por funil permite a separação dos espermatozóides em alta velocidade (11 milhões de espermatozóides X/hora) com 85 a 90% de pureza (JOHNSON & WELCH, 1999).

A primeira sexagem real de sêmen de mamíferos foi com ratazanas *Microtus oregoni* (PINKEL et al, 1982) e foi evidenciada a validade da separação sêmen por citometria de fluxo com o relato do nascimento dos primeiros filhotes de coelhos provenientes de sêmen sexado. Inicialmente o sêmen de coelho foi separado de acordo com o índice de DNA e em seguida foi realizada a IA com sêmen X e Y, observando nascimento de 94% e 84% de precisão para fêmeas e machos, respectivamente (JOHNSON et al 1989).

Segundo BLECHER et al (1999), foram identificadas e isoladas proteínas específicas do sexo, importantes para obtenção de anticorpos específicos contra espermatozóides masculino ou feminino. Desta forma, a incubação dos espermatozóides



e anticorpos anti proteína específica feminino resultou na aglutinação de espermatozóides com cromossomo X e as células espermáticas restante foram utilizadas para produção de embriões *in vitro*, gerando 92% produtos do sexo masculino, porém o efeito de anticorpos anti proteína do macho não foi relatado.

No entanto o único método confiável para a sexagem de espermatozóides, atualmente, é a citometria de fluxo (BODMER et al, 2005) e tem possibilitado maiores avanços comerciais do sêmen sexado (GARNER, 2001). Porém um entrave desta técnica é que a sexagem de espermatozóides descongelado é prejudicada pela alteração de coloração nuclear durante o congelamento (JOHNSON et al, 1994).

Hoje a produção de descendentes de sexo pré-determinados, através da técnica de citometria de fluxo, pode ser feita com acurácia de 90% em suínos (RATH et al, 1997; ABEYDEERA et al, 1998; VAZQUEZ et al, 2003), bovinos (JOHNSON & WELCH, 1999; SCHENK et al, 1999; SEIDEL et al, 1999a; SEIDEL, 2003), eqüinos (BUCHANAN et al, 2000) e humanos (FUGGER et al, 1998). Porém a taxa de prenhez utilizando esta tecnologia é menor quando comprada com sêmen convencional (KURYKIN et al, 2007).

Como a velocidade de separação dos espermatozóides é lenta (3000 a 4000 células/minuto para cada sexo), a dose de sêmen sexado utilizada é baixa, com aproximadamente 2×10^6 espermatozóide/palheta (GARNER, 2006). Para aumentar a concentração de espermatozóide sexado pode-se aumentar a velocidade do fluxo para 18 milhões de células/hora (75% de acurácia), porém é limitada pelo baixo número de espermatozóides viáveis devido a exposição a corantes tóxicos sob alta (JOHNSON & WELCH, 1999).

O sêmen sexado é composto por baixa concentração espermática nas diversas espécies, como eqüinos, bovinos, ovinos e suínos (SEIDEL et al, 1997, 1999a; BUCHANAN et al, 2000; VAZQUEZ et al, 2003; MAXWELL et al, 2004). Segundo DOYLE et al (1999), a utilização de menor número de espermatozóide por dose de sêmen sexado ($1,5 - 2 \times 10^6$) pode comprometer a fertilidade quando comparado com a utilização do sêmen convencional (10×10^6). Estes autores também verificaram que a utilização de uma dose inseminante com mesma concentração de espermatozóides, com



sêmen sexado e convencional, resultou em menor taxa de prenhez nos grupos inseminados com sêmen sexado.

BODMER et al (2005), verificaram que este efeito na fertilidade parece não sofrer variação entre categorias animais, desta forma, a utilização de dose inseminante semelhante, com sêmen sexado não resultou em diferenças significativas da taxa de concepção, sendo de 33,3% e 27,6% para novilhas e vacas, respectivamente.

Efeitos do processo de sexagem

A separação dos espermatozóides por citometria de fluxo induz a capacitação prematura, resultando em uma sobrevivência mais curta e conseqüente redução da fertilidade, o que é uma desvantagem, principalmente ao sêmen que será congelado, porém a utilização deste sêmen sexado *in natura* para FIV é vantajoso, não necessitando da indução da capacitação antes da fertilização (JOHNSON & WELCH, 1999).

A redução da fertilidade com uso de sêmen sexado está relacionada a danos nos espermatozóides durante o processo de separação, coloração, incubação, diluição, centrifugação e exposição a alta pressão e raios laser (SEIDEL & GARNER, 2002). Estes danos interferem no tempo de viabilidade e nos padrões de motilidade espermática (SCHENK et al, 2006).

O processo de sexagem de sêmen de touros além acelerar o processo de capacitação e reação acrossômica, induz mudanças na membrana espermática afetando a fertilização e o desenvolvimento embrionário (MOCE et al, 2006).

Estudos indicam que o processo de sexagem pode danificar o DNA espermático e aumentar a incidência de anormalidades genéticas (GARNER, 2001), porém mais de mil nascimentos originados de sêmen sexado apresentaram-se aparentemente normal fenotipicamente (SEIDEL, 1999b,c; CRAN, 2000).

Como forma de aumentar a qualidade espermática, garantindo maior motilidade e fertilidade, pode-se realizar a sexagem em menor pressão na citometria fluxo, porém verifica-se que há decréscimo da taxa de classificação em 2-3% (SUH & SCHENK, 2003).

Taxa de prenhez após IA convencional com sêmen sexado



Em geral, a taxa de concepção com uso de sêmen sexado é em torno de 50% a 60% da observada na utilização do sêmen convencional (BARUSELLI et al, 2007). As perdas da taxa de prenhez com a utilização do sêmen sexado é de 23% (SEIDEL et al, 1997) e 11,1% em novilhas e 17,2% em vacas leiteiras (BODMER et al, 2005).

Novilhas de leite apresentaram a taxa de concepção após inseminação com sêmen sexado com cerca de 70 a 90% da taxa do obtida com sêmen convencional (SEIDEL et al, 1999a).

Estudos verificaram que a taxa de prenhez de 52% com sêmen sexado criopreservado foi semelhante ao sêmen não congelado (SEIDEL, 1999b, c; SCHENK et al, 1999), demonstrando que o sêmen sexado pode ser criopreservado, favorecendo a distribuição e comercialização deste sêmen para a inseminação, embora os espermatozóides apresentem resultados inferiores de integridade acrossomal, comparados com sêmen convencional (AMANN, 2000).

A taxa de prenhez em novilhas inseminadas com sêmen sexado não congelado foi de 2,6% (1×10^5 espermatozóides/dose) e 22,4% ($2,5 \times 10^6$ espermatozóides/dose), sendo menor quando comparando com sêmen não sexado não congelado que apresentou taxa de 41%, 50% e 61%, referentes, respectivamente, às concentrações de 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^6$ espermatozóides/dose, o que indica menor fertilidade do sêmen sexado (SEIDEL et al, 1997).

BODMER et al (2005), verificaram uma diferença significativa da taxa de prenhez em novilhas inseminadas com sêmen sexado (2×10^6 espermatozóides/dose), em comparação com sêmen convencional, sendo 33,3% e 59,3%, respectivamente. A taxa de prenhez reduzida observada em novilhas inseminadas com sêmen sexado pode estar relacionada com a baixa dose inseminante, baixa motilidade pós descongelamento, fragilidade espermática e condições de manejo (detecção de cio, horário de inseminação, sanidade e alimentação). Resultados semelhantes foram observados por WEIGEL (2004), também em novilhas inseminadas com sêmen sexado e convencional, apresentando taxa de prenhez de 35-40% e 55-60%, respectivamente. Segundo SEIDEL (1999a), a taxa de concepção após a inseminação artificial com sêmen sexado, em novilhas de corte cruzadas, foi de 40%, sendo este índice inferior ao obtido em IA com sêmen não sexado (75%).



Vacas de leite de alta produção após IA com sêmen sexado (2×10^6 espermatozóides/dose) apresentaram taxa de prenhez de 21%, enquanto que com sêmen convencional (15×10^6 espermatozóides/dose) este índice foi de 46%. Mesmo com índice inferior o uso do sêmen sexado foi efetivo para a produção de bezerras fêmeas nascidas (82%), em comparação com 49% do sêmen convencional (ANERSSON et al, 2004).

BODMER et al (2005) não verificaram diferenças significativas na taxa de concepção, 27,6% e 28,1% referentes respectivamente a vacas inseminadas com baixa concentração espermática (2×10^6 espermatozóides/dose) de sêmen sexado e não sexado após descongelamento.

Inseminação intracornual próximo ao local de fertilização

Estudos demonstraram aumento da taxa de gestação quando o sêmen em baixa concentração é depositado próximo ao local de fertilização (junção útero tubária) em comparação com a inseminação convencional no corpo do útero. Como vantagem deste método de inseminação pode-se ressaltar a redução da exposição do sêmen ao ambiente hostil. A deposição de 2×10^6 espermatozóides não sexado, próximo a junção útero tubária, apresentou aumento na taxa de gestação em comparação com a deposição sêmen na porção média do corno uterino (KURYKIN et al, 2006).

Estudos com novilhas cruzadas demonstraram uma taxa de concepção de 62% com sêmen sexado, a uma concentração de $1,5 \times 10^6$ espermatozóides/dose, depositado profundamente no corno uterino. Esta taxa observada foi maior do que quando utilizaram sêmen sexado na mesma concentração (40%), ou sêmen não sexado a uma concentração de 20×10^6 espermatozóides/dose (51%), depositados no corpo uterino (SEIDEL, 1999a).

Segundo DOYLE (1999), a taxa de concepção, em vacas Angus lactantes, com sêmen convencional congelado (40×10^6 espermatozóides/dose) depositado no corpo uterino e com metade da dose em cada corno (1×10^6 espermatozóides/dose) foi 67% e 49%, respectivamente, enquanto que esta taxa foi de 23% e 25%, respectivamente, com utilização de sêmen sexado congelado (1×10^6 espermatozóides/dose) e resfriado (5×10^5 espermatozóides/dose), também depositado com metade em cada corno.



SEIDEL et al (1998) verificaram taxa de prenhez similar (aproximadamente 50%) após inseminação intracornual com sêmen sexado não congelado (3×10^5 espermatozóides/dose) e inseminação convencional com sêmen não sexado criopreservado ($15,6 \times 10^6$ espermatozóides/dose).

A taxa de gestação em novilhas inseminadas com deposição do sêmen sexado descongelado diretamente no corno uterino na concentração de $1,5-3 \times 10^6$ espermatozóides/dose variou de 33% para 68%, aproximando-se da taxa de 70-90% utilizando sêmen não sexado descongelado ($20-40 \times 10^6$ espermatozóides/dose) em inseminação convencional (SEIDEL et al, 1999a).

A taxa de prenhez reduzida devido à baixa concentração de espermatozóides pode ser evitada com a deposição do sêmen próximo do local de fertilização (corno ipsilateral à ovulação), associado à sincronização do estro e a inseminação por tempo fixo (HUNTER, 2001). Porém, segundo KURYKIN et al (2007), novilhas da raça Holstein sincronizadas e inseminadas por tempo fixo com sêmen sexado para cromossomo X ($2,2 \times 10^6$ espermatozóides/dose) depositado no corpo uterino, porção media do corno uterino e porção final do corno uterino, não tiveram diferenças significativas na taxa de prenhez. Resultados semelhantes foram observados em experimentos utilizando sêmen sexado, em baixa concentração, não congelado (SEIDEL et al, 1998) e criopreservados (SEIDEL et al, 1999a).

Uso de sêmen sexado associado a FIV e à superovulação

CRAN et al (1993) utilizaram o sêmen sexado de touros para a produção embriões a partir de oócitos amadurecidos *in vitro* e em seguida estes foram transferidos, gerando prole com sexo predeterminado. Esta descoberta favoreceu o potencial comercial da sexagem e tecnologia da FIV.

O sêmen sexado na utilização na produção de embriões *in vitro* reduz o custo do teste de progênie em cerca de 33%, o que permite a transferência somente de embriões do sexo desejado (NICHOLAS, 1996).

O desenvolvimento dos protocolos da técnica de fecundação *in vitro* exige pequeno número de espermatozóides para fertilizar um oócito, permitindo a utilização



de sêmen sexado. Porém, o uso de sêmen sexado não congelado resultou em apenas 66% de clivagem e 16 a 20% de desenvolvimento embrionário (LU et al, 1999).

Segundo SARTORI et al (2004), a percentagem de fertilização de oócitos com sêmen comercial foi de 90% enquanto com sêmen sexado foi de 60%, em novilhas holandesas. Observaram também que o número de espermatozóides acessórios presente na zona pelúcida de oócitos degenerados e não fertilizados foi maior com utilização do sêmen não sexado, indicando que o estoque espermático no oviduto dos animais que foram inseminados com sêmen sexado é insuficiente para fertilizar oócitos superovulados.

A avaliação da produção de embriões em vacas Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado ($4,2 \times 10^6$ espermatozóides/dose) em comparação com sêmen convencional (40×10^6 espermatozóides/dose) resultou em menor número de embriões transferíveis e congeláveis, além de maior taxa de oócitos não fertilizado, com uso do sêmen sexado. Porém o sêmen sexado (90% de acurácia) permitiu a produção de mais embriões com sexo de interesse do que o sêmen convencional (BARUSELLI et al, 2007).

BODMER et al (2005) observaram que a taxa de clivagem foi de 23,5% para o sêmen sexado e 33% para o sêmen convencional e a perda embrionária de 15,8% para o grupo do sêmen sexado e 2,9% para o não sexado. As perdas embrionárias maiores tanto em vacas como em novilhas com o uso do sêmen sexado (17,2% e 11,1% respectivamente) quando comparadas com sêmen convencional (0% e 5,6%). A alta taxa de aborto no 2º-3º mês de gestação pode ser causada por danos ao DNA dos espermatozóides durante o processo de citometria de fluxo.

A utilização do sêmen sexado em vacas e novilhas reduz a taxa de fertilização, aumenta proporção de embriões degenerados (SARTORY et al, 2004) e diminui a percentagem de embriões transferíveis após a superovulação (SCHENK et al, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expansão do uso do sêmen sexado depende da metodologia compatível com características desejadas para garantir aumento da produtividade e avanço genético, tais como: não afetar a capacidade fecundante; ser produzido em larga escala; garantir taxa



de prenhez satisfatória; permitir congelabilidade com redução das perdas e lesões espermáticas, apresentar separação eficiente dos espermatozóides em sêmen descongelado e apresentar baixo custo, devendo preocupar-se também com a acurácia do processamento e viabilidade após o descongelamento. Desta forma, a sexagem pode possibilitar um maior ganho genético, eficiência de produção e maior flexibilidade no manejo do rebanho, bem como a preservação de fêmeas ou machos dependendo da demanda do mercado, resultando num maior ganho econômico.

Entretanto a produção comercial de sêmen bovino ainda ocorre em pequena escala, podendo atender a um mercado restrito, pois existe obstáculos a serem vencidos, como o tempo de separação, viabilidade e número de espermatozóides por dose inseminante, diluidores específicos para permitir o transporte e preservação do sêmen sexado, além do custo da dose inseminante.

O aumento da fertilidade com o uso do sêmen sexado esta associado a seleção dos animais (redução dos efeitos individuais dos touros), ao manejo reprodutivo das fêmeas, otimização do processo de sexagem, criopreservação e inseminação.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMANN RP. Issues impacting commercialization of sexed sperm. In: Proceedings of the British Society of Animal Science Annual Meeting. **Scarborough, United Kingdom**; 2000:37–38.

ANDERSSON M, TAPONEN J, KOSKINEN E, DAHLBOM M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology** 2004;8:1583–8.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Relatório Anual**, São Paulo, p.4, 2005.

BARUSELLI, PS; SOUZA, AH; MARTINS, CM; GIMENES, LU; SALES, JNS; AYRES, H; ANDRADE, AFC; RAPHAEL, F; ARRUDA, RP. Sêmen sexado:



inseminação artificial e transferência de embriões. **Ver. Bras. Reprod. Anim.** v.31, n.3, p.374-381, 2007.

BLAECHER, SR; HOWIE, R; LI, S; DETMAR, J; BLAHUT, LM. A new approach to immunological sexing sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1309-22, 1999.

BODMER M, JANNET F, HAÛSSIG 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 condition. **Theriogenology** 2005;64:1647-55.

BUCHANAN BR, SEIDEL JR GE, MCCUE PM, SCHENK JL, HERICKHOFF LA, SQUIRES EL. Inseminations of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. **Theriogenology** 2000;53:1333-44.

CRAN DG, JOHNSON LA, MILLER NGA, COCHRANE D, POLGE C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilization. **Vet Rec.** 1993;132:40-41.

DEMATAWEWA, CMB; BERGER, PJ. Break-even cost of cloning in genetic improvement of dairy cattle. **J. Dairy Sci**, v.81, p.1136-47, 1998.

DOYLE SP, SEIDEL, GE JR, SCHENK JL, ET AL. Artificial Insemination of Lactating Angus Cows with Sexed Semen. In: Proceedings of the West Sect Am Soc **Anim Sci** 1999; 50:203-205.

FUGGER EF, BLACK SH, KEYVANFAR K, SCHULMAN JD. Birth of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. **Human Reprod** 1998;13:2367-70.

GARNER, DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v.65, p.943-957, 2006.



GARNER, DL. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals (Review). **Journal of Andrology**, v.22, n.4, 2001.

GARNER DL, GLEDHILL BL, 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**. 1983;28:312–321.

GLEDHILL BL, PINKEL D, GARNER DL, VAN DILLA MA. Identifying X- and Y chromosome- bearing sperm by DNA content: retrospective perspective and prospective opinions. In: AMANN RP, SEIDEL GE JR, eds. *Prospects For Sexing Mammalian Sperm*. Boulder: **Colorado Associated University Press**; 1982:177–191.

HOHENBOKEN, WD. Applications of sexed sêmen in cattle production. **Theriogenology**, v.52, p.1421-33, 1999.

HOSSEPIAN DE LIMA VFM. Espermatozoide sexado bovino:quando utiliza-lo? **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34 (supl), p.213-224, 2006.

HUNTER RHF. New breeding opportunities with deep corneal insemination: exploiting modern sperm technologies in cattle. **Reprod Dom Anim** 2001;36:217–22.

JOHNSON LA,WELCH GR. Sex pre-selection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y bearing sperm for maximum efficiency. **Theriogenology** 1999;52:1323–42.

JOHNSON, LA; CRAN, DG; POLGE,C. recent advances in sex preselection of cattle: flow cytometric sorting of X-Y chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. **Theriogenology**, v.41, p.51-56, 1994.

JOHNSON LA, FLOOK JP, HAWK HW. Sex pre-selection in rabbits: live birth from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biol Reprod** 1989;41:199–203.



KURYKIN, J; JAAKMA, U; JALAKAS, M; AIDNIK, M; WALDMANN, A; MAJAS, L. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the in estrus-synchronized heifers. **Theriogenology**, v67, p.754-759, 2007.

KURYKIN J, JAAKMAU" ,WALDMANN A, JALAKAS M, AIDNIK M, MAJAS L, et al. Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF2a treatment or at spontaneous estrus. **Anim Reprod Sci** 2006;95:116–24.

LU KH, CRAN DG AND SEIDEL GE, JR. In Vitro Fertilization with Flow Cytometrically-sorted bovine Sperm. **Theriogenology**, 1999; 52:1393-1405.

MAXWELL WMC, EVANS G, HOLLINSHEAD FK, BATHGATE R, DE GRAAF SP, ERIKSSON BM, et al. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Anim Reprod Sci** 2004;82/83:79–95.

MOCE E, GRAHAM JK, SCHENK JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology** 2006;66:929–36.

MOTA, AV. **Sexagem de espermatozóides em mamíferos domésticos**. Monografia apresentada a disciplina de Seminário em Reprodução Animal do programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária- UNESP, Botucatu-SP, 2004.

NICHOLAS, FW. Genetic improvement through reproductive technology. **Anim Reprod Sci**, v.42, p.205-14, 1996.

RUVUNA, F; TAYLOR, JF; WALTER, JP; TURNER, JW.bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III.Embryo lines production bulls. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1091-97, 1991.



SARTORY R, SOUZA AH, GUENTHER JN, GEIGER LN, SCHENK JL, WILTBANK MC. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Anim Reprod** 2004;1: 86–90.

SCHENK JL, SUH TK, SEIDEL JR GE. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology** 2006;65:299–307.

SCHENK JL, SUH TK, CRAN DG, SEIDEL GE JR. Cryopreservation of flowsorted bovine sperm. **Theriogenology**. 1999;52:1375–1391.

SEIDEL JR GE, GARNER DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2002;124:711–4. Seidel Jr GE. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology** 2003;59:585–98.

SEIDEL GE JR. Sexing mammalian spermatozoa and embryos—state of the art. **J Reprod Fertil**. 1999a;(suppl 54):475–485.

SEIDEL GE JR. Commercializing reproductive biotechnology—the approach used by XY, Inc. **Theriogenology**. 1999b;51:5.

SEIDEL JR GE, HERICKHOFF LA, SCHENK JK, DOYLE SP, GREEN RD. Artificial insemination of heifers with cooled, unfrozen sexed semen. **Theriogenology** 1998;49:365 (abstract).

SEIDEL JR GE, ALLEN CH, JOHNSON LA, HOLLAND MD, BRINK Z, WELCH GR, et al. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. **Theriogenology** 1997;48:1255–64.

SUH TK, SCHENK JL. Pressure during sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. **Theriogenology** 2003;59:516 (abstract).



TAYLOR, ST; THIESSEN, RB; MOORE, AJ. Single sex beef cattle systems. In: SMITH, C; KING, JWB; McKAY, JC (Ed). **Exploiting new technologies in animal breeding**. Oxford University Press, p. 183-193, 1986.

VAN DILLA MA, GLEDHILL BA, LAKE S, DEAN PN, GRAY JW, KACHEL V, BARLOGIE B, GOHDE W. Measurement of mammalian sperm deoxyribonucleic acid by flow cytometry-problems and approaches. **J Histochem Cytochem**. 1977;25:763-773.

VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA, PARILLA I, ROCA J, GIL MA, VAZQUEZ JL. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology** 2003;59:1605-14.

WEIGEL, KA. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. **J. Dairy Sci**, v.87, p.E120-E130, 2004.

