

# EFECTO DE LA PREPARACIÓN ESPERMÁTICA PREVIO A LA FERTILIZACIÓN *in vitro* SOBRE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y EL ADN DE SEMEN BOVINO SEXADO

## EFFECT OF SPERM PREPARATION BEFORE *in vitro* FERTILIZATION ON PLASMA MEMBRANE AND DNA OF BOVINE SEX-SORTED SEMEN

Daniel Ángel<sup>1</sup>, Natalia Pérez<sup>1</sup>, Andrés Pareja Zoot MSc<sup>2</sup>, Omar Camargo<sup>3</sup>, Rodrigo Urrego Zoot MSc<sup>4</sup>

Recibido el 26 de agosto de 2009 y aceptado el 20 de noviembre de 2009

### Resumen

La utilización de semen sexado en la producción bovina posee un sinnúmero de ventajas. La combinación de la producción *in vitro* de embriones (PIV) con semen sexado permite ser más eficiente en la utilización de este material de alto costo económico con respecto a la inseminación artificial, cuando se utiliza semen sexado disminuyen las tasas de fecundación *in vitro* (FIV) y desarrollo embrionario. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de semen bovino sexado a través de la prueba del test hiposmótico (HOST) y el ensayo cometa, respectivamente. Tres tratamientos fueron usados; 1) espermatozoides sin centrifugar 2) espermatozoides lavados y seleccionados mediante percoll, un método que utiliza la centrifugación y 3) control positivo, espermatozoides sometidos a estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 200 µM. Se observó que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ) entre el tratamiento 1 y 2. Pero si se observa una diferencia ( $p < 0.05$ ) entre el semen centrifugado y no centrifugado con respecto al control positivo. Igualmente sucede con la integridad del ADN. En conclusión, la técnica de preparación a través de percoll no altera la integridad de la membrana plasmática ni el ADN bajo ciertas condiciones, por lo que se sugiere la utilización de este protocolo para la preparación espermática previo a la fertilización *in vitro* al no tener efectos deletéreos sobre la membrana plasmática y el ADN. Sin embargo, se sugiere evaluar las tasas de clivaje y blastocistos producidos utilizando dicho protocolo.

### Palabras clave

Test hiposmótico, ensayo cometa, percoll.

### Abstract

The use of sex-sorted semen in cattle production has many advantages. The use of *in vitro* embryo production (IVP) with sex-sorted semen allow a more efficient use of this high economic cost material on artificial insemination, using sexed semen on *in vitro* fertilization (IVF) rates and embryonic development decreased. The objective of this study is to evaluate the effect of centrifugation on the plasma membrane and DNA of bovine sex-sorted semen through hyposmotic test (HOST) and the comet assay, respectively. Three treatments were used: 1) sperm non centrifuged 2) sperm washed and selected by percoll, using centrifugation and 3) positive control, sperm subjected to oxidative stress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a final concentration of 200 µM. It was noted that there is not difference ( $p > 0.05$ ) between treatment 1 and 2. But there is difference ( $p < 0.05$ ) between semen centrifuged and non centrifuged respect to the positive control. Same applies to the integrity of DNA. In conclusion, Percoll does not alter the plasma membrane integrity or DNA under certain conditions, it is suggested the use of this protocol for sperm preparation prior to *in vitro* fertilization, because I has not deleterious effects on the plasma membrane and DNA. However, it is suggested to evaluate the cleavage and blastocyst produced rates using this protocol.

<sup>1</sup> Est MVZ Grupo de Investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES

<sup>2</sup> Zoot MSc. Grupo de Investigación Biología CES-EIA Programa de Biología CES-EIA

<sup>3</sup> MVZ MSc Grupo Biogenésis, Universidad de Antioquia

<sup>4</sup> Zoot MSc Grupo de Investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES. [rurrego@ces.edu.co](mailto:rurrego@ces.edu.co)

## Key words

Hyposmotic test, comet assay, percoll.

## Introducción

Desde el inicio de este milenio, el semen bovino sexado ha comenzado a tener una alta aplicabilidad comercial. La preselección del sexo es de alto interés tanto para la industria de leche como para la de carne ya que tener nacimientos con un sexo deseado posee ventajas en la producción comercial <sup>(10)</sup>. En 1987, Johnson y colaboradores <sup>(14)</sup> desarrollaron una técnica que permite separar espermatozoides con cromosoma X y espermatozoides con cromosoma Y con base a las diferencias de cantidad de ADN entre las dos poblaciones celulares a través de citometría de flujo (US Patent #5135759).

El método para medir el contenido de ADN en células espermáticas individuales se hace a través de un fluorocromo específico de ADN, Hoeschst 33342, dependiendo de la intensidad de la fluorescencia los espermatozoides son separados por el clitómetro de flujo. Se ha probado que el procedimiento para separar espermatozoides con cromosoma X y Y es efectivo y posee una eficiencia alrededor del 90% <sup>(15)</sup>.

De otro lado, la producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos es una excelente herramienta que se viene utilizando en combinación con semen sexado, presentando una positiva relación costo beneficio <sup>(25)</sup>. Una dosis de semen sexado tiene un valor mucho más elevado que una dosis de semen convencional y por tanto, debe de ser aprovechada al máximo <sup>(35, 41)</sup>. La PIVE permite un mejor aprovechamiento del semen, ya que se requiere una concentración más baja de espermatozoides para llevar a cabo la fecundación comparada con las concentraciones requeridas en la inseminación artificial; además, una sola dosis puede ser utilizada para muchas vacas <sup>(11, 39, 41)</sup>.

También la PIVE en bovinos se ve beneficiada con la técnica del sexaje de semen, debido a que el sexo predeterminado de los embriones mejora la relación costo beneficio de la técnica, sin un costo adicional, y se evita el desperdicio de embriones y el comprometimiento de la tasa de gestación que ocurre con los embriones biopsiados para determinar el sexo antes de la transferencia embrionaria <sup>(28, 40)</sup>. Una de las limitaciones del uso de semen sexado en la PIVE es

la alta variabilidad en los resultados, reducción de las tasas de fecundación y de desarrollo embrionario <sup>(25)</sup>. Probablemente, la causa de estas variaciones sea el hecho de que durante la producción de semen bovino sexado y congelado las células son expuestas a numerosos factores que pueden afectar su capacidad fecundante como la dilución, la incubación, la exposición a un fluorocromo, presiones elevadas, láser de luz UV, congelación y en el laboratorio donde se vaya a llevar a cabo la fertilización *in vitro* (FIV) el semen debe de ser descongelado y preparado con el propósito de obtener una fracción espermática con capacidad fecundante y libre de crioprotectores, para lo cual los espermatozoides deben de ser centrifugados.

Los numerosos factores que pueden afectar a los espermatozoides pueden producir especies reactivas de oxígeno (EROS)<sup>6,7</sup>. Se ha comprobado que las EROS generadas en la manipulación del semen bovino pueden causar un daño oxidativo, el cual altera el adecuado funcionamiento de la membrana plasmática de los espermatozoides; además, puede causar fragmentación en el ADN de los espermatozoides <sup>(4, 37)</sup>.

Dos técnicas que permiten evaluar la integridad de la membrana plasmática y la integridad del ADN en el semen bovino sexado son el test hipoosmótico (HOST) y el ensayo cometa, respectivamente. El HOST, es una técnica desarrollada para evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Su principio consiste en que al someter los espermatozoides a condiciones hipoosmóticas, los espermatozoides bioquímicamente activos permitirán la entrada de agua mostrando diferentes grados de turgencia en un esfuerzo por mantener la dinámica del equilibrio entre los fluidos de sus compartimientos interno y el entorno extracelular.

Esta respuesta se asocia con el grado de integridad normal de la membrana y la actividad funcional de la misma, requisito indispensable para que se de la reacción acrosómica durante el proceso de fertilización<sup>8</sup>. Y el ensayo cometa o electroforesis en gel de una sola célula, es una técnica rápida, simple, visual y sensible para medir y analizar quiebres de ADN en células de mamíferos <sup>(21, 30, 31)</sup>.

Esta técnica ha sido adaptada para medir quiebres en el ADN de las células espermáticas y aunque el procedimiento varía de laboratorio a laboratorio, éste se ha basado principalmente en los siguientes pasos: preparación de una solución espermática, la puesta en un gel, lisis celular, desnaturalización del ADN, electroforesis, neutralización, tinción del ADN y el análisis de las imágenes<sup>34</sup>. Por su alta sensibilidad el ensayo cometa se ha venido utilizando ampliamente para evaluar la integridad del ADN de las células espermáticas sometidas a diferentes condiciones de estrés oxidativo<sup>(37)</sup>.

Por ende, el objetivo de este estudio fue determinar si la integridad de la membrana plasmática evaluada por HOST por ensayo cometa de los espermatozoides bovinos sexados pueden ser afectada por el proceso de preparación espermática previo a la fertilización *in vitro*.

## Materiales y métodos

### *Preparación del semen*

Para este trabajo se utilizaron pajillas de semen bovino sexado y congelado de 0.5 ml provenientes de un solo toro de la raza Holstein. Las pajillas de semen fueron descongeladas a 35 °C por un periodo de 1 min. Después de descongelar, el semen fue inmediatamente sometido a uno de los tres tratamientos: 1) espermatozoides sin centrifugar 2) espermatozoides lavados y seleccionados mediante un método que utiliza la centrifugación y 3) un control positivo, realizado con espermatozoides sometidos a estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 200 µM.

### *Gradiente diferencial de percoll (centrifugación)*

En la técnica de percoll, la muestra de semen previamente descongelado fue puesta sobre el gradiente de percoll que contenía 1.0 ml de percoll con un gradiente de densidad de 45% y 90%. Se llevó a cabo la centrifugación a 700 x g por 10 min a temperatura ambiente. Después de remover el sobrenadante, los espermatozoides fueron resuspendidos en medio FIV-TALP y ajustada a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml.

Los espermatozoides que no fueron sometidos a la preparación espermática (tratamiento 1), una vez descongelada la pajilla, el semen fue sometido a las evaluaciones de la integridad de membrana plasmática y ADN. Para los espermatozoides del tratamiento 3, una

vez descongelada la pajilla el semen fue lavado en medio FIV-TALP y mezclado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 200 µM como control positivo.

### *Ensayo cometa*

Para evaluar el efecto de la preparación espermática sobre el ADN del semen bovino sexado se utilizó el protocolo de ensayo cometa propuesto por Shen y Ong<sup>34</sup>. De cada tratamiento se utilizaron concentraciones de 5 X 10<sup>5</sup> espermatozoides/ml suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % (en PBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>) en portaobjetos pretratados con 100 µl de agarosa de punto de fusión normal al 0.5 % (en PBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>).

Después de 10 min a temperatura ambiente, los portaobjetos fueron colocados en solución de lisis I (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 % DMSO y 1 % de Triton X 100) a un pH de 10.0, por 1 hora a 4 °C; posteriormente las placas fueron pasadas a lisis II (2.5M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 10 mM Tris, 200 µg/ml de proteinasa K y 300 mM de DTT) a un pH de 7.4 por un periodo de 18 horas a una temperatura de 37.5 °C. Terminada la lisis II las placas fueron incubadas en buffer de electroforesis (0.3 M NaOH, 200 mM, EDTA) a un pH 13.0 por un periodo de 10 min en un cuarto oscuro a 4°C. Luego, se realizó el corrido electroforético durante 10 min a 25 V y 300 mA.

El siguiente paso fue lavar las láminas portaobjetos con buffer neutralizante (0.4 M Tris-HCL; pH 7.5) y deshidatarlas con metanol puro, una vez secas se tiñeron con 40 µl de bromuro de etidio (20 µg/ml). Finalmente, los portaobjetos fueron visualizados en un microscopio Axiolab-Zeiss provisto de un sistema de fluorescencia y equipado con una cámara CCD SONY (DSC-S85 de 4.1 mega pixeles), con un aumento de 200X. Las imágenes de 50 cometas seleccionados aleatoriamente fueron analizadas con un software analizador de imágenes (Comet Score) proporcionado gratuitamente en Internet por la empresa TriTek-Corp. La variable para cuantificar el daño en el ADN fue el Momento de Olive (OTM).

### *Test Hipoosmótico*

Para evaluar el efecto de la preparación espermática sobre la membrana de las células espermáticas mediante el test HOS, se utilizó el protocolo propuesto por Correa y Zavos<sup>8</sup> para espermatozoides bovinos. Debido a que se conoce que los azúcares y los electrolitos mantienen la

integridad funcional de los espermatozoides, se preparó una solución compuestas por un azúcar (fructosa) y un electrolito (citrato de sodio) en agua pura Milli Q-UF. La osmolaridad de la solución fue 100 mOsmol/L verificada con osmómetro.

Se hizo una adición y mezcla de 100 µl de la muestra que contiene los espermatozoides con 500 µl de la solución hipoosmótica. La mezcla fue incubada a 38.5 °C por 30 min. Posteriormente, se evaluó la reacción hipoosmótica espermática colocando una gota de la muestra bien mezclada sobre un portaobjetos, que fue cubierto con un cubreobjetos y observado bajo microscopio de contraste de fases a 400X.

Se contaron un total aproximado de 100 células espermáticas, considerando como positivos al test HOS los espermatozoides que presenten doblez o hinchazón en sus piezas medias o enrollamiento de sus piezas principales. El porcentaje de espermatozoides reaccionados se calculó con el número de células reaccionadas al HOST sobre el número total de espermatozoides contados en la misma placa.

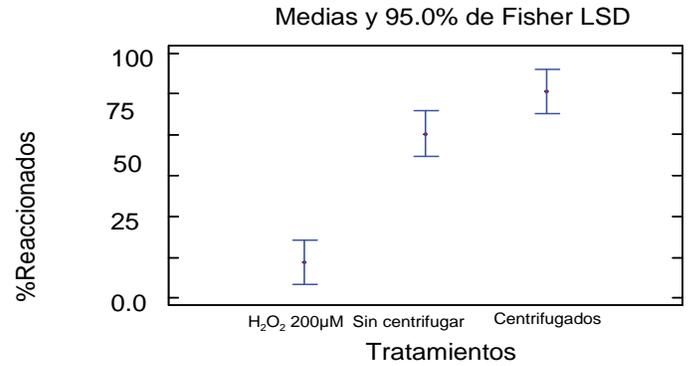
### Análisis estadístico

Se utilizó semen sexado y congelado de un mismo lote de un toro de fertilidad comprobada. El análisis estadístico de los datos se efectuó por análisis de varianza y las correspondientes pruebas de medias Fisher. Para el análisis, los datos obtenidos por el test HOS fueron transformados con la formula raíz del dato más 0.5. Las pruebas se realizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

## Resultados

En la figura 1, se muestra la comparación de medias para espermatozoides reaccionados positivamente al test HOS. En dicha figura, se observa que no hay diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) entre el semen bovino sexado, congelado y descongelado y el semen bovino sexado congelado, descongelado y sometido a preparación espermática previo a la FIV, lo que involucra centrifugar el semen para la realización del gradiente de diferencial de percoll. Pero si se observa una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre el semen centrifugado y no centrifugado con respecto al control positivo realizado con  $H_2O_2$  200 µM.

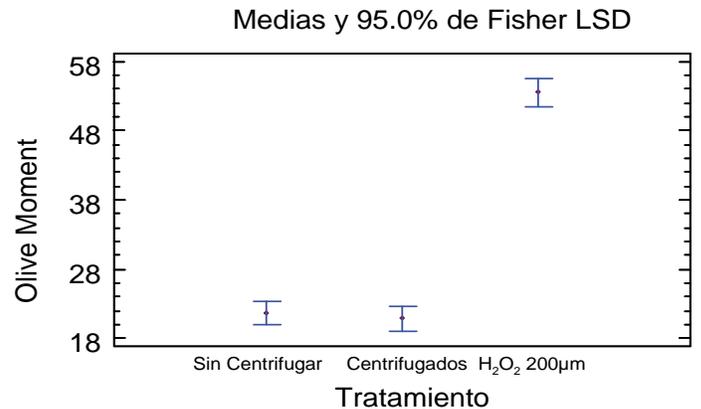
**Figura 1.** Efecto de la preparación espermática sobre la integridad de la membrana plasmática.



Comparación de medias para los espermatozoides sexados y reaccionados (positivos) al test HOS. No se observa diferencia estadística significativa entre los espermatozoides sin centrifugar y los centrifugados por un periodo de 10 min. 700 x g ( $p < 0.05$ ). El control positivo realizado con  $H_2O_2$  tuvo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el resto de los tratamientos.

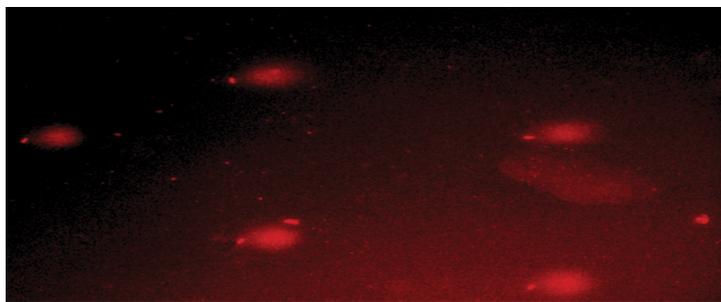
En las figuras 2 y 3, se muestra el efecto de la centrifugación sobre el ADN de las células espermáticas. Entre los espermatozoides seleccionados con centrifugación y los seleccionados sin centrifugación no hay diferencia significativa pero entre estos dos tratamientos y el  $H_2O_2$  sí hay diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figura 2.** Efecto de la centrifugación sobre la fragmentación del ADN.



Comparación de las medias para el Momento de Olive. No se observa diferencia estadística significativa entre los espermatozoides no centrifugados con respecto a los que han sido centrifugados por 10 min 700. x g ( $p < 0.05$ ). Se observa diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre los demás tratamientos y el control positivo realizado con  $H_2O_2$  a una concentración final de 200 µm.

**Figura 3.** Imagen de espermatozoides bovinos sexados después de haber sido descongelados.



La fluorescencia más brillante y circular (cabeza del cometa) corresponde al núcleo del espermatozoide y a la izquierda la “cola del cometa” difusamente teñida, la cual representa el daño en el ADN del semen bovino sexado.

## Discusión

Una de las mayores preocupaciones a la hora de utilizar comercialmente el semen sexado es que la fertilidad es inferior comparado con semen no sexado. Durante el sexaje, los espermatozoides son expuestos a una serie de condiciones como la tinción del ADN, procesos de dilución, altas presiones, centrifugación, lo que puede afectar la integridad espermática, la estructura de la membrana, el citoesqueleto, la morfología espermática, la integridad del ADN y otros aspectos de la célula espermática (4, 19, 20, 22, 25).

Está situación es agravada con el proceso de criopreservación posterior al sexaje, lo que conlleva a que parámetros como la vitalidad postdescongelación, la movilidad y la integridad acrosómica sea más baja con respecto a un semen no sexado<sup>32</sup>. De hecho, cuando sea utilizado una dosis de semen sexado y congelado en los programas de inseminación artificial (IA), las tasas de preñez bajan entre un 20-40% con respecto al semen convencional (33, 39). De igual forma, los primeros estudios en donde se utiliza semen sexado para producir embriones *in vitro*, las tasas de desarrollo son bastante bajas con respecto al semen no sexado (18).

Además, en la FIV bovina los espermatozoides deben de ser sometidos a un procedimiento de lavado y selección en el cual los de mejor movilidad son separados del plasma seminal, de los muertos e inmóviles, de los diluyentes y crioprotectores y de otras estructuras por medio de una técnica ampliamente utilizada en los bovinos que es el gradiente diferencial de percoll<sup>9,16,27</sup>. Esta técnica requiere como mínimo una centrifugación, paso fundamental en

el lavado y selección de los espermatozoides, en el cual se puede generar daño a la membrana plasmática de los gametos masculinos (2, 30, 31) y aumentar la producción basal de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) (2, 23, 36).

En el presente estudio, se evaluó el efecto de la preparación espermática por gradiente percoll previo a la fertilización *in vitro* con semen bovino sexado, sobre la membrana plasmática y el ADN, dichas variables fueron evaluadas a través de las técnicas HOST y ensayo cometa, respectivamente. Se encontró que no hubo diferencia estadística significativa entre los espermatozoides no centrifugados con respecto a los que han sido centrifugados por 10 min 700. x g ( $p < 0.05$ ). Pero si se observó diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre los demás tratamientos y el control positivo realizado con  $H_2O_2$  a una concentración final de 200  $\mu$ m.

Estos datos concuerdan parcialmente con los publicados por Urrego *et al* (37) quienes evaluaron en semen no sexado si la integridad de la membrana plasmática y el ADN de los espermatozoides pueden ser afectados por la centrifugación realizada en el proceso de lavado y selección.

En relación con los espermatozoides con reacción positiva al test HOS, no observaron diferencia estadística significativa entre los espermatozoides no centrifugados y los centrifugados por un periodo de 10 y 30 min, pero si encontraron diferencia con los espermatozoides que fueron centrifugados por un periodo de 45 min. Lo cual concuerda con este estudio en donde se encontró que unas condiciones de 10 min de centrifugación a 700 x g para la realización del gradiente diferencial de percoll no posee un efecto deletéreo sobre la integridad de la membrana plasmática de semen bovino sexado.

Pero en dicho estudio, se encontró que la centrifugación de los espermatozoides por un tiempo de 10, 30 o 45 min a 700 x g para la realización del gradiente diferencial de percoll tiene un efecto deletéreo sobre el ADN de los espermatozoides bovinos<sup>37</sup>. Esto difiere por lo encontrado en este estudio, en donde la preparación espermática no tiene efecto sobre la integridad del ADN, pero si se observa que el semen bovino sexado antes de la preparación espermática trae alterada la integridad del ADN (ver figura 3).

Presumiblemente, el daño en el ADN es el resultado de la combinación de efectos como la tinción del material genético y la posterior exposición a un láser de luz

UV necesaria para realizar la separación de las células y su posterior criopreservación <sup>(29)</sup>. Se ha mostrado en espermatozoides de conejo que el daño en ADN aumenta en la medida en que la intensidad del láser sea mayor<sup>13</sup>. Catt y colaboradores <sup>(5)</sup>, tiñeron espermatozoides humanos con el fluorocromo Hoechst 33342 y luego los expusieron a luz UV sin encontrar cambios en la frecuencia de quiebres en el ADN. En semen porcino también se ha encontrado que el Hoechst 33342 no posee efecto genotóxico <sup>(26)</sup>. Por otro lado, se ha demostrado en espermatozoides de humano <sup>(3)</sup>, de ratón <sup>(21)</sup> y de bovino <sup>(24)</sup> que la criopreservación está asociada al estrés oxidativo.

Además, el congelamiento y descongelamiento de los espermatozoides bovinos aumenta la generación de EROs <sup>(6)</sup>, produciendo alteraciones en el citoesqueleto

<sup>(12)</sup>, inhibición de la fusión esperma-oocito <sup>(1)</sup>, afectando el axonema del esperma lo cual está asociado con pérdida de movilidad <sup>(38)</sup> y produce daño en el ADN <sup>(17)</sup>.

## Conclusión

La técnica de preparación de semen sexado a través del gradiente diferencial de percoll no altera ni la integridad de la membrana plasmática ni del ADN bajo unas condiciones de 10 min de centrifugación a 700 x g, por lo que se sugiere la utilización de este protocolo para la preparación espermática previo a la fertilización al no tener efectos deletéreos sobre la membrana plasmática y sobre el ADN. Sin embargo, se podría evaluar las tasas de clivaje y blastocistos producidos utilizando dicho protocolo.

1. Aitken JR, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41:183-97.
2. Aitken RJ, Clarkson S. Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. *J. Androl* 1988; 9:367-376.
3. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992; 13:232-41.
4. Boe-Hansen GB, Morris ID, Annette B, Ersbølla K, Greve T, Christensen P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology* 2005; 63: 1789–802.
5. Catt SL, Sakkas D, Bizzaro D, Bianchi PG, Maxwell WMC, Evans G. Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometric sorting does not affect the frequency of detected endogenous DNA nicks in abnormal and normal human sperm. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:821–5.
6. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 2001; 59:451–8.
7. Chatterjee S, Laloraya M, Kumar PG Free radical-induced liquefaction of ejaculated human semen: a new dimension in semen biochemistry. *Arch Androl.* 1997 Mar-Apr; 38(2):107-11.
8. Correa, J.R., Zavos, P.M. (1996). Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology.* 7: 1225–1232.
9. Dode M, Rodovhalo NC, Ueno VG, Fernandes CE. The Effect of Sperm Preparation and Co-Incubation Time on *In Vitro* Fertilization of *Bos indicus* Oocytes. *Anim Reprod Sci* 2002; 69:15-23.
10. Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vander Zwaag DF, Ferre´ LB. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* 2003; 59(1):125–38.
11. Hidalgo, C.O., I. Fernández, P. Duque, N. Facal, E. Díaz, J.M. Prendes, J. Menéndez, E. Gómez, L. Prieto y C. Díez. Primeros terneros producidos *in vitro* tras punción ecoguiada de folículos ováricos. *Archivos de zootecnia* vol. 51, núm. 196, p. 413, 2002.
12. Hinshaw DB, Sklar LA, Bohl B, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Rossi MW, *et al.* Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol* 1986; 123:454 - 64.
13. Johnson LA, Cran DG, Welch GR, Polge C. Gender preselection in mammals. In: Miller RH, Pursel VG, Norman HD, editors. *Beltsville symposium XX: biotechnology's role in the genetic improvement of farm animals.* Savoy, IL: Amer Soc Anim Sci; 1996. p. p.151–164.

14. Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res* 1987; 16(1):1–9.
15. Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999; 52:1323–41.
16. Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. (2003). Influence of the Duration of Gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 77:33-49.
17. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential use for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:896-900.
18. Lu KH, Cran DG, Seidel Jr GE. *In vitro* fertilization with flowcytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 1999; 52:1393–405.
19. Maxwell WMC, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:433–40.
20. Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 1165–78.
21. Mazur P, Katkov I, Katkova N, Critser JK. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation [Oxyrase] to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*; 2000 40:187–209.
22. 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.
23. Niwa K, Ohgoda O. Synergistic Effect of Caffeine and Heparin of *In Vitro* Fertilization of Cattle Oocyte Mature in Culture. *Theriogenology* 1988; 30:733-741.
24. O’Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *J Androl* 1997; 29:269-75.
25. Palma G. A, Olivier N.S, Neumüller Ch y Sinowatz F, Effects of Sex-sorted Spermatozoa on the Efficiency of *in vitro* Fertilization and Ultrastructure of *in vitro* Produced Bovine Blastocysts, *Anat. Histol. Embryol.* 37, 67–73 (2008).
26. Parrilla I, Vazquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D, et al. Hoechst 33342 stain and UV laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 2004; 128:615–21.
27. Parrish JJ, Krogenas A, Susko-Parrish L. Effect of Bovine Sperm Separation by Either Swim-up or Percoll Method on Success of *In-vitro* Fertilization and Early Embryonic Development. *Theriogenology* 1995; 44:859-869.

28. Pivato I. Effect of different hormonal treatments and nutrition in donors of oocytes on *in vitro* bovine embryo production. Universidad Federal de Pelotas. Pelotas: Brazil. Thesis 2001.
29. Rath D, Moench-Tegeder G, Taylor U, Johnson LA. Improved quality of sex sorted sperm of sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology*. 2009 Jan 1; 71(1):22-9. Epub 2008 Nov 7.
30. Risopatrón J, Sanchez R, Sepulveda N, Peña P, Villagran E, Miska W. Migration /Sedimentation Sperm Selection Method Used in Bovine *In Vitro* Fertilization: Comparison With Washing/Centrifugation. *Theriogenology* 1996; 46:65-73.
31. Sánchez R, Risopatrón J, Sepulveda G, Peña P, MiSka W. Evaluation of the Acrosomal Membrane in Bovine Spermatozoa: Effects of Proteinase Inhibitors. *Theriogenology* 1995; 45:761-768.
32. Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel Jr GE. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 52: 1375–91.
33. Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, et al. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 1999; 52:1407–20.
34. Shen HM, Ong CN. Detection Of Oxidative ADN Damage In Human Sperm and its Association with Sperm Function and Male Infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:529-536.
35. Thibier M. 2005. Data Retrieval Committee Annual Report, Year 2004. *IETS Newsl*, 23:11-17.
36. Twigg J, Irvine D.S, Houston P, Foulton N, Michale L, *et al*. Latrogenic ADN Damage Induced in Human Spermatozoa During Sperm Preparation: Protective Significance of Seminal Plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:439-444.
37. Urrego R. Rios A, Olivera M. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos, *Rev Colomb Cienc Pecu* 2008; 21:19-26.
38. Ward WS, Zalensky AO. The unique complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*. 1996; 6:139-47.
39. Wheeler, M. B., J. J. Rutledge, A. Fischer-Brown, T. VanEtten, S. Malusky, and D. J. Beebe: Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology*, 2006; 65, 219–227.
40. Wilson, R. D., K. A. Weigel, P. M. Fricke, J. J. Rutledge, M. L. Leibfried-Rutledge, D. L. Matthews, and V. R. Schutzkus. *In vitro* production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *J. Dairy Sci*. 2005; 88:776–782.
41. Xu J, Chaubal SA, Du F Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*. 2009 Jan 1; 71(1):39-47. Epub 2008 Oct 22.