

PROYECTO SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS

Fecha: 27/10/2020

PARTICIPANTES:

- CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL DE GANADERÍA
- CENTRO INTEGRADO DE FORMACIÓN Y EXPERIENCIAS AGRARIA DE LORCA
- ASOCIACIÓN DE CRIADORES DE CABALLOS DE RAZAS PURAS DE LA REGIÓN DE MURCIA
- HUMECO – PRODUCTOS VETERINARIOS





Antecedentes

De conformidad con los objetivos prioritarios para todos los CRN establecidos en el Plan de Actuación Plurianual Estatal aprobado por la LXXI Comisión Permanente del Consejo General de Formación Profesional en reunión de 10 de octubre de 2018, las partes acuerdan como objetivos del plan de actuación plurianual 2019-2022 del CRN de Ganadería en su ámbito de actuación:

Con respecto al Objetivo 15. Establecer vínculos de colaboración de los CRN con el sector productivo de ganadería, con entidades públicas y privadas, con los agentes sociales, estableciendo redes virtuales y acuerdos de transferencias tecnológicas, innovación y experimentación de actividades y productos, intercambio de actividades y recursos en programas e iniciativas nacionales e internacionales.

El CRN de Ganadería en este ámbito y teniendo en cuenta el Convenio de Colaboración publicado en el BORM número 140 de fecha viernes, 19 de junio de 2020, "Resolución de la Secretaria General de la Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente, por la que se publica el convenio de colaboración entre la Administración General de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería Pesca y Medio Ambiente, y la Asociación de Criadores de Caballos de Razas Puras de la Región de Murcia (A.C.C.R.P.R.M.) en materia de formación, investigación y transferencia tecnológica, para la mejora genética de la cabaña de



equinos, en las instalaciones del Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA) también Centro de Referencia Nacional de Ganadería de Lorca (CRN)”, dada nuestra participación en el mismo, los distintos departamentos del CRN han considerado de sumo interés la participación del centro en el proyecto SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS.

Introducción

El sexo de la descendencia está determinado por el par de cromosomas sexuales (XX o XY) formado por la fertilización de un óvulo (cromosoma X) por un espermatozoide que lleva cualquiera de los dos cromosomas X o Y.

Los espermatozoides de mamífero se dividen en espermatozoides femeninos (cromosoma X) y espermatozoides masculinos (cromosoma Y). Aproximadamente, el 50% de los espermatozoides son portadores del cromosoma X y el 50% de los espermatozoides son portadores del cromosoma Y.

Por lo tanto, la proporción natural de sexos es generalmente 50:50 de descendencia femenina: descendencia masculina.

En producción ganadera, existe un interés enorme en el desarrollo de una tecnología reproductiva capaz de controlar el sexo de la descendencia.



Estado de la tecnología

En 1982, científicos del Departamento de Agricultura de EE. UU., de la Universidad de Colorado y la Universidad de Cambridge, descubrieron que la determinación y separación por sexo de los espermatozoides, se puede realizar basándose en una diferencia en el contenido de ADN según la longitud de los cromosomas X e Y de los espermatozoides. En efecto, el cromosoma X es mucho más grande que el cromosoma Y y contiene mucho más ADN. Supuestamente, el espermatozoide X sería también más pesado y se movería a menor velocidad. En función de estas diferencias, se han intentado numerosos métodos físicos de separación de las dos poblaciones: migración de acuerdo con la motilidad de los espermatozoides, centrifugación, etc siendo la separación por citometría de flujo el único método eficaz hasta la fecha.

Esta tecnología de la que es propietaria la empresa Sexing Technologies (Navasota, Texas), se basa en la diferencia de longitud entre los cromosomas X e Y. Los cromosomas de los espermatozoides se tiñen con una tinción fluorescente, y luego son procesados en un citómetro a alta presión. Las células se analizan mediante un láser que incide en el fluorocromo y un fotodetector que detecta la cantidad de fluorescencia emitida por cada espermatozoide. El citómetro está conectado a un "sorter" o clasificador de células que convierte la fluorescencia emitida en pulsos eléctricos diferentes, que separan por carga eléctrica las dos poblaciones de espermatozoides. Una vez que los espermatozoides se ordenan, la muestra se vuelve a analizar para confirmar la pureza de la población de espermatozoides deseada.



Estos procesos de clasificación física provocan la pérdida de muchos espermatozoides sin clasificar, y afectan significativamente a la motilidad y la tasa de supervivencia de los espermatozoides, debido al estrés por centrifugación, dilución, presión así como por la estimulación láser y eléctrica. También existen muchas dudas sobre la seguridad genética de la descendencia, debido a un posible efecto negativo del fluorocromo que se une al ADN de los espermatozoides.

Además, la eficiencia de la técnica es muy baja. Aunque los números de espermatozoides analizados por hora han aumentado desde 1-2 millones a principios de la década de 1990 a los 70-80 millones actuales en algunas especies, el proceso sigue siendo ineficiente en la producción de la cantidad de espermatozoides suficiente para una dosis estándar de IA.

Sólo en el ganado vacuno, existe un verdadero mercado y las dosis de semen sexado de toro se venden a un precio aproximadamente 4 veces más alto que el semen normal. Además, la cantidad de espermatozoides en las pajuelas de semen es aproximadamente 5-10 veces menor que la cantidad de espermatozoides en una pajuela normal, lo que disminuye las tasas de gestación.

Por último, este método requiere equipos costosos y personal especializado, y se necesitan instalaciones especializadas.

Actualmente, existe una necesidad urgente de desarrollar una nueva técnica para superar los problemas del método de clasificación de espermatozoides descrito anteriormente.



Muchos científicos están estudiando para encontrar un biomarcador capaz de distinguir entre el esperma X y el esperma Y.

Producción de semen sexado por citometría en el ganado equino

En la especie equina, las tasas de gestación con semen fresco sexado por citometría han oscilado entre el 10% y el 40% al inseminar con entre 5 y 25 millones de espermatozoides sexados, por inseminación endoscópica o inseminación profunda guiada transrectalmente.

La utilización de dosis con bajo número de espermatozoides y la alta dilución del eyaculado podrían, en algunos casos, tener un efecto adverso en las tasas de gestación. De hecho, se sabe que existe una reducción en la fertilidad equina cuando la concentración de espermatozoides es inferior a los 5 millones/ml. Las tasas de concepción mejores se han obtenido inseminando 1 millón de espermatozoides sexados diluidos en 100-250 mL de diluyente por vía histeroscópica.

El sexaje de semen congelado o la congelación de semen sexado, no han producido resultados satisfactorios en la especie equina. Las tasas de gestación publicadas han oscilado entre el 0% y el 16,6%, inseminando entre 5-20 millones de espermatozoides por inseminación histeroscópica o profunda.

Los espermatozoides sexados equinos también se han utilizado en la inyección intracitoplásmica (ICSI). Desafortunadamente, los resultados han sido muy pobres.



Sexado inmunológico de los espermatozoides

Las diferencias de ADN observadas entre los espermatozoides X e Y en diferentes especies conllevan la posibilidad de que estas diferencias de ADN también puedan dar lugar a diferencias de proteínas. La expresión diferencial de genes entre los espermatozoides X e Y puede dar lugar a variaciones fenotípicas en los espermatozoides X e Y. El concepto básico de los métodos inmunológicos para la determinación del sexo de los espermatozoides se basa en las diferentes proteínas presentes en la superficie de los espermatozoides X e Y. La teoría detrás de este concepto es que si uno puede aislar / identificar tales marcadores, entonces se podrían desarrollar anticuerpos contra proteínas de superficie específicas de X y / o Y. Posteriormente, el uso de técnicas de microesferas magnéticas o la cromatografía de afinidad, proporcionarían un proceso de separación por grupos.

En 2015 el Dr Dongku Kim patenta un innovador método inmunológico de sexaje de espermatozoides, consistente en un anticuerpo frente a una proteína de membrana de los espermatozoides Y. Este anticuerpo incubado con las muestras de semen, es capaz de aglutinar a los espermatozoides Y. De esta manera, estos espermatozoides quedan atrapados, sin capacidad de moverse, mientras que los espermatozoides X quedan libres. Si se insemina una hembra con esta población de espermatozoides tratada con el



anticuerpo, los espermatozoides tienen una posibilidad de fecundar al ovocito muy superior. Así, los resultados preliminares de inseminación con semen sexado bovino con este anticuerpo, dan unas tasas de fertilidad normales y unas tasas de sexado superiores al 80%.

El método de sexaje resulta enormemente sencillo: se añade la proteína previamente descongelada a aproximadamente 50 millones de espermatozoides y se incuba la mezcla durante aproximadamente 30 minutos a 37°C. Se comprueba la reacción de aglutinación de los espermatozoides al microscopio y se insemina.

Además, existe la posibilidad de filtrar el semen tratado y recuperar los espermatozoides del cromosoma Y aglutinados. Estos espermatozoides aglutinados se pipetea varias veces, para separarse y usarse como dosis de inseminación para producir machos.

Aunque la mayoría de las pruebas de inseminación publicadas corresponden a la especie bovina o búfalos, el inventor indica que puede ser utilizado en cualquier especie de mamífero.

Mercado del semen sexado equino

Una encuesta realizada en Holanda por F. de Graaf en 2010 entre 2500 propietarios de yeguas de la KFPS (Real Asociación de Caballo Frisón) indicó que el 8,1% de los encuestados estaban muy interesados, el 13,4% estaban interesados, el 31,1% estaban ligeramente interesados y el 34,7% de los encuestados no estaban interesados en el uso de semen sexado. Del 34,7% de los encuestados que no estaban



interesados en usar semen clasificado por sexo, el 58,6% indicó que no era ético y contra la naturaleza y el 33,8% respondió que no tenía ningún deseo de obtener potros con un sexo específico. De todos los criadores que mostraron interés en la tecnología, el 62,6% seleccionaría a las hembras y el 28,9% solicitaría caballos machos. En esta encuesta, el costo adicional y el hecho de que el procedimiento no era natural fueron los factores más importantes contra esta biotecnología.

Otras asociaciones de razas donde parece haber una demanda de un género específico serían los caballos de polo y los caballos machos en caballos de rienda. Independientemente de la raza, el deseo de selección de un género es subjetivo y depende de impresiones de individuos que creen que las hijas de un semental en particular son mejores, mientras que otros creen lo contrario. Sin embargo, un nicho de mercado para el semen sexado serían las hembras de reposición. Algunos podrían querer un potro macho de una yegua en particular para producir un futuro semental, mientras que otros prefieren una yegua como un posible reemplazo de yegua de cría.



Objetivos

El objetivo de este proyecto es probar la tecnología de sexado inmunológico de Nurisci Co. Ltd en la especie equina.

De acuerdo con las instrucciones, proporcionadas por el fabricante del producto, cada vial de producto contiene la dosis de anticuerpo suficiente para sexar un total de 50 millones de espermatozoides y obtener 25 millones de espermatozoides X.

Eficacia del filtrado de semen de manera previa a la inseminación.

El fabricante indica la posibilidad de realizar un filtrado del semen tratado con el objeto de eliminar los espermatozoides aglutinados Y. Posteriormente esos aglutinados pueden deshacerse mediante pipeteto, de manera que se podría obtener una segunda dosis de inseminación, esta vez enriquecida en espermatozoides Y.

En la especie equina, las tasas de gestación con semen fresco sexado por citometría han oscilado entre el 10% y el 40% al inseminar con entre 5 y 25 millones de espermatozoides sexados, por inseminación endoscópica o inseminación profunda guiada transrectalmente. Con el método inmunológico esperamos obtener una mejor fertilidad, ya que los espermatozoides no sufren ningún tipo de estrés durante el proceso de sexado. En todo caso, el proyecto se dividirá en las siguientes fases o hitos:



HITO 1. Valoración de la dosis de IA

Descripción: Inseminación de un grupo de 30 yeguas con 25 millones de Spz sexado (1 dosis WM, 1 pajuela de 0,5 ml) mediante la técnica de IA profunda. Evaluación de fertilidad y eficacia del sexado.

Inseminación de un grupo de 30 yeguas con 50 millones de Spz sexado (2 dosis WM, 2 pajuelas de 0.5 ml) mediante la técnica de IA profunda. Evaluación de fertilidad y eficacia del sexado.

Fechas: Diciembre de 2020- Junio 2021

HITO 2. Evaluación del efecto del filtrado y la congelación del semen sexado

Filtrado de semen e inseminación de yeguas con semen filtrado en fresco y postdescongelación: 15 yeguas con semen descongelado y enriquecido en Spz X y 15 yeguas con semen descongelado enriquecido en Spz Y. La dosis de inseminación, será de al menos 50 millones de espermatozoides totales.

Fechas: Julio 2021- Diciembre 2021



Material y métodos

Inseminación con semen fresco

Se utilizarán yeguas en edad reproductiva y buena condición corporal. Las yeguas serán sometidas a exámenes ginecológicos y seguimiento ecográfico al comienzo del tratamiento, verificando que estén no-gestantes, ciclando normalmente, con úteros en condiciones sanas y ovarios sin anormalidades.

La información acerca del crecimiento folicular y la ovulación se tomará a partir de la palpación rectal y ultrasonografía realizada diariamente a todas las yeguas estudiadas.

Las 60 yeguas serán distribuidas al azar en los dos grupos de inseminación (n=30/grupo) una vez detectado el celo y la presencia de un folículo preovulatorio (diámetro superior a 38 mm a la ecografía):

Grupo 1 : IA con 25 millones de espermatozoides sexados hembra

Grupo 2: IA con 50 millones de espermatozoides sexados hembra

Se aplicará la inducción hormonal de la ovulación con GnRH o análogos. Tras la aplicación de las hormonas, se inseminará en torno a 40 horas después, confirmando previamente la presencia de un folículo de tamaño ovulatorio para la raza PRE.

Se realizará inseminación profunda, guiada via transrectal.



Región de Murcia
Consejería de Agua, Agricultura,
Ganadería, Pesca y Medio Ambiente
Dirección General de Agricultura,
Industria Alimentaria y Cooperativismo Agrario

968 46 85 50
crnganaderia@carm.es
Ctra. Águilas Km 2,5 30818
Lorca - Murcia
crnganaderia.es



Las ecografías para confirmar gestación, se realizarán entre los 9-16 días post-ovulación.

Las ecografías de sexaje fetal se realizarán entre los 55 y 70 días de gestación. Todas las ecografías se grabarán en imagen y/o vídeo, para su revisión. La confirmación final del sexo se hará al nacimiento del potro.

Para las ecografías, se utilizará un ecógrafo modelo EXAGO conectado a una sonda lineal rectal multifrecuencia trabajando a 5-7,5 MHz.



ASOCIACIÓN DE CRIADORES DE CABALLOS
DE RAZAS PUNAS DE LA REGIÓN DE MURCIA

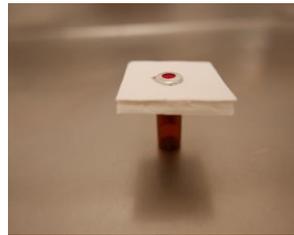


PROTOCOLO WHOLEMOM SEMEN FRESCO

1. Sacar el vial de WholeMom del congelador.



2. Introducir el vial de WholeMon en un flotador de poliespán



3. Calentar el vial de WholeMom durante 5 minutos a **35-37 °C** en el baño maría o similar.



4. Extraer el semen del caballo y centrifugar para eliminar el plasma seminal (1200 g, 10 min). Resuspender en diluyente ., Evaluar ajustando la concentración a 200 millones de Spz por ml y valorando motilidad con el sistema CASA



NURISCIENCE INC.

5. Realizar un agujero en el vial (con una aguja).

Tomar 0,25 ml de semen diluido e introducirlo con una micropipeta en el vial de Wholemom



7. Mezclar bien sujetando la pajuela al vial, para que termine de descender la muestra se semen. Si no termina de descender podemos soplar la pajuela.

8. Esperar durante **30 minutos** en el baño maría a **35-37°C**, para que se produzca la reacción. (Importante esperar los tiempos de reacción para tener una buena eficiencia del producto).



9. Introducir en el vial una pajuela de 0,5 ml y transferir el semen. (Puede llevarse a cabo por succión o inclinando el vial con la pajuela dentro hacia abajo y agitando suavemente para que descienda).



10. Una vez llena la pajuela, retirarla del vial y ya estaría listo para la inseminación.

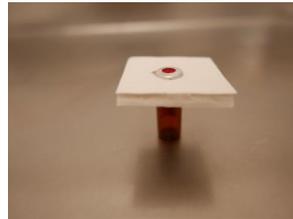


PROTOCOLO WHOLEMOM SEMEN CONGELADO

1. Sacar el vial de WholeMom del congelador.



2. Introducir el vial de WholeMon en un flotador de poliespán



3. Calentar el vial de WholeMom durante 5 minutos a **35-37 °C** en el baño maría o similar.



4. Calentar la pajuela en el baño maría portátil durante **30**



5. Realizar un agujero en el vial (con una aguja) e introducir la pajuela por el lado sin esponja.



NURISCIENCE INC.

6. Una vez introducida cortar la parte superior para que descienda por gravedad el contenido de la misma.



7. Mezclar bien sujetando la pajuela al vial, para que termine de descender la muestra se semen. Si no termina de descender podemos soplar la pajuela.



8. Esperar durante **30 minutos** en el baño maría a **35-37°C**, para que se produzca la reacción. (Importante esperar los tiempos de reacción para tener una buena eficiencia del producto).



9. Introducir en el vial una nueva pajuela y transferir el semen. (Puede llevarse a cabo por succión o inclinando el vial con la pajuela dentro hacia abajo y agitando suavemente para que descienda).



10. Una vez llena la pajuela, retirarla del vial y ya estaría listo para la inseminación.



PROTOCOLO FILTRADO DE SEMEN

Para este protocolo, se utiliza la dosis de WM necesaria para tratar una dosis de semen para lo cual distribuiremos el mismo en tubos Falcon con 70 millones de espermatozoides y una vez centrifugado y eliminado el sobrenadante, rediluiremos con 5 ml. de diluyente teniendo la parte filtrada 5 ml. de diluyente y 25 millones de espermatozoides, quedando una concentración de 5×10^6 espermatozoides por ml. Añadiremos entonces la dosis de WM para separar los X de los Y durante 30-60 minutos.

Los 5 ml de la mezcla tratada se filtrarán a través de un filtro de celulosa de 18 micras de poro:





El semen retenido en el filtro se recuperará enjuagando el filtro en un total de 5 ml de diluyente. Después, se pipeteará la muestra con fuerza para romper los aglutinados. Se evaluará la cantidad de espermatozoides libres tomando una alícuota de 3 microlitros y observándola al microscopio. Una vez comprobado el éxito de la desaglutinación. Obtendremos también una dosis de 25×10^6 espermatozoides o lo que es igual 5×10^6 espermatozoides por ml.

Para la congelación seminal, se centrifugarán ambas muestras a 1200g durante 10 minutos y se resuspenderán en medio de congelación INRAFREEZE, ajustándose la concentración a 200 millones por mililitro, para obtener pajuelas de 0.25 ml con en torno 50 millones de espermatozoides. Se obtendrán en el mejor de los casos unas 20 pajuelas de cada sexo. Después, de la resuspensión se realizará el descenso térmico de los dos tubos de muestra desde los 22°C a los 4°C en un tiempo no inferior a las 2,5 horas. Después el semen se envasará en pajuelas de 0,25 ml y se dejará durante 4 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se congelará en un congelador programable (MicroDigitcool, IMV Technologies)

Evaluación de la congelación de semen sexado sobre la calidad seminal

Para este fin se utilizarán 1 o 2 pajuelas del semen de cada lote (macho/hembra).

El semen congelado se descongelará (37°C durante 30 s).



Para la valoración del semen obtenido por congelación se utilizarán los siguientes parámetros:

- Motilidad individual y progresiva. Debido a la subjetividad de las observaciones bajo el microscopio del porcentaje de espermatozoides móviles, y debido al gran número de conteos a realizar durante el desarrollo del proyecto, se adquirirá un software para el análisis de semen asistido por ordenador (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA modelo IVOS), con el objeto de realizar una evaluación más fiable de la motilidad de los espermatozoides, y de la repetitibilidad de los resultados. Para la prueba de resistencia térmica, la incubación de los espermatozoides congelados-descongelados se prolongará hasta 1 hora a 37°C para cada muestra. Luego, el análisis CASA se realizará nuevamente en cada muestra.

Inseminación con semen congelado y sexado.

Se utilizarán yeguas en edad reproductiva y buena condición corporal. Las yeguas serán sometidas a exámenes ginecológicos y seguimiento ecográfico al comienzo del tratamiento, verificando que estén no-gestantes, ciclando normalmente, con úteros en condiciones sanas y ovarios sin anomalías.

La información acerca del crecimiento folicular y la ovulación se tomará a partir de la palpación rectal y ultrasonografía realizada diariamente a todas las yeguas estudiadas.



Se inseminarán al menos 10 yeguas con cada lote de semen (macho/hembra). El semen congelado se descongelará (37°C durante 30 s).

Se aplicará la inducción hormonal de la ovulación con GnRH o análogos. Tras la aplicación de las hormonas, se inseminará en torno a 40 horas después, confirmando previamente la presencia de un folículo de tamaño ovulatorio para la raza PRE.

Se realizará inseminación profunda, guiada via transrectal, depositándose al menos una pajuela de 0,25 ml conteniendo al menos 50 millones de espermatozoides sexado descongelados.

Las ecografías para confirmar gestación, se realizarán entre los 30-45 días post-inseminación. Las ecografías de sexaje fetal se realizarán entre los 55 y 70 días de gestación. Todas las ecografías se grabarán en imagen y/o vídeo, para su revisión. La confirmación final del sexo se hará al nacimiento del potro.

Para las ecografías, se utilizará un ecógrafo modelo EXAGO conectado a una sonda lineal rectal multifrecuencia trabajando a 5-7,5 MHz.

Análisis estadístico

Para determinar el efecto del tratamiento sobre la gestación de las yeguas, se utilizará el test de Chi-cuadrado y para comparar los diferentes grupos experimentales se realizará un análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de test de Duncan.



Memoria económica

7.1 Instalaciones, instrumentos y técnicas disponibles para la realización del proyecto.

Instalaciones:

Este proyecto se realizará en las instalaciones del Centro Integrado de Formación y Experiencias agrarias (CIFEA) de Lorca, Centro de Referencia Nacional de Ganadería.

Equipos:

Sistema CASA IVOS

Espectrofotómetro SMD5 para valoración de concentración espermática y espermacue.

Baño maría 20 l, con regulación de temperatura hasta 99°C.

Vitrina refrigerada para descenso de temperatura controlada de semen hasta +4°C.

Envasadora automática MRS1, de una aguja, para pajuelas de 0.5 y 0.25ml.

Purificador de agua MILLIPORE

Estufa



Centrífuga Centronic BL, con cabezal oscilante para tubos de 15 y de 50ml.

Cámara frigorífica para el almacenamiento de diluyentes y reactivos.

Congelador programable ICECUBE para descenso de temperatura de semen hasta – 150° C

Ecógrafo EXAGO con sonda lineal rectal L760

7.2. Presupuesto.

a) Personal necesario para el proyecto:

FP2 para manejo de sementales y auxiliar en la parada (horas imputadas: 30)	600,00€
FP2 ayuda en recolección y preparación de semen (horas imputadas: 30)	600,00€
Investigador principal (horas imputadas: 1000)	30.000,00€
Total personal	31.200,00 €



b) Adecuación y mejora instalaciones

Adecuación y mejora de cumbreta (BOX) para estancia de sementales y yeguas	4.000,00€
Cerramiento instalaciones para estancia y salvaguarda de equinos	4.500,00€
Adecuación terrenos para picadero de recepción de sementales	5.000,00€
Total	13.500,00 €

c) Gastos de funcionamiento y otros.

Gastos de alimentación diaria.	2700,00€
Alojamiento (cama) de yeguas	1500,00€
Material fungible de laboratorio (pajuelas, vainas,...)	3000,00€



Diluyentes, y reactivos	500,00€
Gastos de nitrógeno líquido y portes	300,00€
Anticuerpo sexado 200 unidades	2500,00€
Total gastos de funcionamiento	10.500,00€

d) Dietas y locomoción.

Desplazamiento y alojamiento formación a HUMECO sexaje fetal y manejo de WM	1.680,00€
Dietas y alojamiento reunión fin de hito (2)	1.000,00€
Total dietas y locomoción	2.680,00€

Total presupuesto 57.880 euros



Bibliografía

Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. Theriogenology 2006;65:943-57.

Garner DL, Seidel GE Jr. History of commercializing sexed semen for cattle. Theriogenology 2008;69:886-95.

Johnson LA, Flook JP, Look MV. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. Gamete Res 1987;17:203-12.

Johnson LA, Pinkel D. Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. Cytometry 1986;7:268-73.

Rens W, Welsch GR, Johnson LA. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome bearing sperm. Cytometry 1998;33:476-81.



Clulow JR, Evans G, Morris LH, Maxwell WM. Factors influencing the “sortability” of stallion spermatozoa into X- and Y-chromosome bearing populations. Anim Reprod Sci 2009;113:220-8.

Gibb Z, Morris LH, Maxwell WM, Grupen CG. Use of a defined diluent increases the sex-sorting efficiency of stallion sperm. Theriogenology 2011;75:610-9.

Leahy T, Marti JI, Crossett B, Evan G, Maxwell WM. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins from flow cytometrically sorted ram sperm. Theriogenology 2011;75:962-71.

Buchanan BR, Seidel GE, McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA, Squires EL. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. Theriogenology 2000;53:1309-21.

Lindsey AC, Morris LH, Allen WR, Schenk JL, Squires EL, Bruemmer JE. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of non-sorted or flow sorted spermatozoa. Equine Vet J 2002;34:128-32.

Lindsey AC, Schenk JL, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. Equine Vet J 2002;34:121-7.

Lindsey AC, Varner DD, Seidel GE Jr, Bruemmer JE, Squires EL. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5 degrees C or 15 degrees C prior to flow-cytometric sorting. Anim Reprod Sci 2005;85:125-30.

Clulow JR, Buss H, Sieme H, Rodger JA, Cawdell-Smith AJ, Evans G, et al. Field fertility of sex-sorted and non-sorted frozen-thawed stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci 2007;108:287-97.

Jasko DJ. Evaluation of stallion semen. Vet Clin North Am Equine Pract 1992;8:129-48.

Morris LH, Allen WR. An overview of low dose insemination in the mare. Reprod Domest Anim 2002;37:206-10.

Clulow JR, Buss H, Sieme H, Rodger JA, Cawdell-Smith AJ, Evans G, et al. Field fertility of sex-sorted and non-sorted frozen-thawed stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci 2008;108:287-97.

Gibb Z, Grupen CG, Maxwell WM, Morris LH. Improvements in the fertility of cryopreserved, sex-sorted stallion sperm after low-dose hysteroscopic insemination [abstract]. In: International.

Symposium on Equine Embryo Transfer; July 29, 2012; Vancouver, BC, Canada.

Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo- Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez L, et al. Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl* 2008;29:213-21.

Galli C, Lazzari G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod Domest Anim* 2008;43(Suppl 2):1-7.

Knop K, Hoffmann N, Rath D, Sieme H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci* 2005;89:294-7.

Heer P. Adjustment of cryopreservation of stallion spermatozoa to the Beltsville Sperm Sexing Technology [doctorial thesis]. Hannover, Germany: University of Veterinary Medicine Hannover; 2007.

Buss H. Improvement of the freezability of sex-sorted stallion spermatozoa [thesis]. Hannover, Germany: University of Veterinary Medicine Hannover; 2006.