

Biología de la Reproducción

Situación actual de la selección de sexo

Current situation of sex selection

Cuevas I¹, Llácer J¹, Ten J², Mendiola J², Bernabeu R²

¹Instituto Bernabeu. Elche.España. ²Instituto Bernabeu. Alicante. España

Resumen

El propósito de la siguiente revisión es exponer las técnicas para seleccionar el sexo de la futura descendencia y las posibles aplicaciones clínicas y sociales, dependiendo de la legislación vigente.

La selección del sexo posfecundación se puede llevar a cabo mediante diagnóstico genético preimplantacional (DGP) donde se determina el sexo de los embriones obtenidos tras un proceso de Fecundación "in vitro" transfiriéndose al útero únicamente los embriones del sexo deseado. El DGP se puede realizar bien por: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por hibridación "in situ" fluorescente (FISH).

En otros casos lo que se realiza es una selección genética preconcepcional (SGP) de gametos masculinos, que consiste en la separación de espermatozoides con la dotación genética sexual deseada (X o Y).

Palabras clave: Selección de sexo. DGP. FISH. PCR. Citometría de flujo

Summary

The intention of the following revision is to expose the techniques to select the sex of the future descendants and the possible clinical and social applications, depending on the actual legislation. The postfecundation sex selection can be carried out by means of preimplantational genetic diagnosis (DGP) where the sex of the embryo obtained after "in vitro" fertilization is determined, transferring into the uterus only the embryos of wished sex. The DGP can be made by the polymerase chain reaction (PCR) or by fluorescent "in situ" hybridization. (FISH). In other cases which is made it is a preconceptional genetic selection (PGS) of masculine gametes, a spermatozoa separation of the desired genetical dotation (X or Y).

Key words: Sex selection. PGD. FISH. PCR. Flow cytometry

Correspondencia: Dra. Irene Cuevas
Instituto Bernabeu
Hermanos González Selva, 1
03203 Elche (España).

INTRODUCCIÓN

La selección de sexo es un tema que siempre ha interesado al hombre, ya que bien por motivos sociales o culturales, prácticamente todas las culturas han preferido tener varones en lugar de mujeres. Éstos, siempre han tenido muchas más funciones, y las mujeres en la mayoría de los casos, tan sólo eran útiles para criar a la descendencia y otros menesteres considerados femeninos. Pero como la excepción confirma la regla, resulta curioso encontrar tribus como la Igbo (de África occidental) o la Subanun (de Filipinas) en las que tener una descendiente hembra es considerado una ventaja, sobretodo por el precio que se le pone a la mujer a la hora de casarla ("el precio de la novia").

Ya sobre el año 500 a.c., un filósofo griego llamado Anaxágoras, se aventuró a afirmar que los espermatozoides producidos por el testículo derecho daban lugar a machos, en cambio, los del izquierdo a hembras. Esta creencia se mantuvo hasta el siglo XVIII, con lo que en aquella época no era descabellado proponer extracción quirúrgica del testículo izquierdo para evitar la descendencia femenina.

En cambio, el médico griego Hipócrates pensaba que los sémenes masculino y femenino se mezclaban, y se producía un feto del sexo del más fuerte.

Muchas prácticas se han llevado a cabo a lo largo de los años, pero siempre con la misma finalidad, como recitar poemas durante el coito, programar las relaciones en función de las fases lunares, colgar los pantalones en un lado u otro de la cama.

Afortunadamente, en la actualidad se dispone de la tecnología suficiente para llevar a cabo una selección de sexo, que quizá en un futuro también sirva de introducción para alguna revisión, pero que hoy en día son, al menos, más fiables y menos traumáticas, para algunos caballeros, que las utilizadas antaño.

APLICACIONES

Las dos aplicaciones que tiene en la actualidad el uso de la tecnología para seleccionar el sexo del futuro hijo son:

- 1.-Evitar enfermedades ligadas al sexo- en la actualidad hay descritas alrededor de 500 enfermedades de este tipo, donde las hembras serían portadoras y los machos afectados de la enfermedad con una probabilidad del 50%. Algunos de los ejemplos más conocidos son la hemofilia, la distrofia muscular de Duchenne o el retraso muscular ligado al X.

- 2.-"Family balancing"- este término hace referencia a la elección del sexo de menos del 50% de la descendencia de una pareja.

En el caso de evitar enfermedades ligadas al sexo, la aplicación de las técnicas, que comentaremos posteriormente, no está siendo demasiado cuestionada y sobretodo a nivel científico es aceptada. Ahora bien, en el caso de la segunda aplicación es donde ha surgido la polémica.

SITUACIÓN ACTUAL

Se ha argumentado que con la selección de sexo indiscriminada se podría alterar el sex ratio natural (106 machos: 100 hembras, en la especie humana), especialmente en los Países subdesarrollados, donde todavía supone un favor tener un hijo varón y una desgracia una hembra. Incluso hay lugares en los que se incentiva a las parejas que tienen un niño (como por ejemplo en la India).

En Estados Unidos, Fugger y colaboradores (25) llevaron a cabo un estudio en el que se preguntaba a las parejas que acudían al Centro de Reproducción Asistida por su preferencia en el sexo del futuro bebé. En el 53,6% de los casos, las parejas preferían una niña, con lo que el sex ratio no se vería modificado sobremanera. Hay que decir que la mayor parte de las parejas que solicitaron información en el Centro donde se llevó a cabo el sondeo (90,5% de los casos) lo hicieron por family balancing.

En países subdesarrollados el uso indiscriminado de estas técnicas si que podría suponer un problema, ya que todavía hoy se premia el nacimiento de un varón. Recientemente, un grupo de la India ha publicado la realización de 42 ciclos con 14 gestaciones clínicas con selección de embriones masculinos (1).

La situación en España queda muy clara en la Ley 35/1988 sobre Técnicas de Reproducción Asistida en su artículo 20º,B,f donde reza: "Son infracciones muy graves: la selección de sexo o la manipulación genética con fines no terapéuticos o terapéuticos no autorizados".

TÉCNICAS ACTUALES

En la actualidad se puede llevar a cabo una selección del sexo del futuro bebé mediante dos tipos de técnicas (2), que se llevan a cabo siempre mediante Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

- 1.-Diagnóstico preimplantacional- se seleccionan los embriones XX o XY, previamente diagnosticada-

dos, que se van a transferir al útero de la mujer tras fertilización "in vitro".

2.-Selección genética preconcepcional- se lleva a cabo una selección de espermatozoides X o Y que son los que realmente van a determinar el sexo del embrión, ya que el ovocito siempre aporta el otro cromosoma X. Esta selección es en realidad un enriquecimiento de las muestras seminales en un tipo u otro (X o Y) de espermatozoides.

EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

El primer embarazo llevado a cabo con éxito lo realizaron en el Reino Unido Winston y Handyside en el año 1990 (3), donde una mujer portadora de hemofilia dio a luz una niña sana. En España fue una gestación gemelar conseguida en el año 1994 (4) donde nacieron dos niñas, también en el caso de madre portadora de hemofilia.

El DGP requiere la realización de un ciclo de FIV/ICSI y tiene una fiabilidad de aproximadamente el 95-97%. Las tasas de gestación son aceptables, teniendo en cuenta la alta manipulación embrionaria que precisan y oscilan alrededor del 20-25%.

La estimulación ovárica de la paciente se lleva a cabo igual que para un ciclo de Fecundación "in vitro". Se realiza punción ovárica transvaginal para la extracción de los ovocitos e inseminación/micoinyección de éstos. Los cigotos se cultivan en el laboratorio hasta que se consiguen embriones de 6-8 células (día 3 de cultivo embrionario). En este estadio se realiza biopsia embrionaria de 1 o 2 blastómeras (con 2 aumenta la eficacia de la técnica), bien con solución de ácido Tyrodes o con láser. Se lleva a cabo el análisis de la dotación de cromosomas sexuales de la/s célula/s biopsiada/s y los embriones biopsiados se mantienen en cultivo en el laboratorio hasta tener los resultados, cuando se realizará la transferencia de los embriones seleccionados ya en estadio de blastocisto.

El análisis cromosómico se puede llevar a cabo mediante tres tipos de técnicas:

1.-Citogenética clásica- se hace una visualización directa de los cromosomas del embrión (cariotipo). Esta técnica tiene una baja eficiencia, por lo que no tiene actualmente aplicación clínica.

2.- PCR (Polymerase Chain Reaction)- Se detecta la presencia/ausencia del cromosoma Y, amplificando una secuencia específica de este cromosoma. En primer lugar se lleva a cabo una digestión con en-

zimas de restricción para obtener las secuencias específicas de DNA que se quieran amplificar. En la actualidad se amplifican secuencias tanto del cromosoma X como del Y para detectar posibles fallos de amplificación y aumentar así la eficacia de la técnica. (Figura 1) Se realiza el amplificado en un termociclador mediante ciclos de desnaturalización del DNA, adhesión de primers específicos de la secuencia a amplificar y síntesis y elongación de cadenas mediante la polimerasa. Los resultados de la amplificación se visualizan por PCR fluorescente o electroforesis y se seleccionarían los embriones deseados según los resultados obtenidos.

Para esta técnica los embriones deben proceder de un microinyección de espermatozoides, ya que mediante FIV convencional, las muestras podrían tener contaminación de DNA de los espermatozoides que quedan adheridos a la zona pelúcida.

Se ha estimado que esta técnica tiene una tasa de error de aproximadamente del 2%, debida a fallos de amplificación o a contaminación por otras células.

3.- FISH (Fluorescence In Situ Hybridation)- Se visualizan los cromosomas sexuales de la blastómera por fluorescencia. Se lleva a cabo una desnaturalización del centrosoma de los cromosomas y posteriormente una hibridación con sondas específicas de cada tipo de cromosoma unidas a fluorocromos que se ponen de manifiesto al ser excitados en un microscopio de fluorescencia (Figura 2). Se suelen analizar al mismo tiempo 3 cromosomas: X, Y y 18, ya que la comercialización de las sondas incluye las 3 (Vysis AneuVysion 18/X/Y).

En la actualidad es la técnica que más se utiliza, a pesar de que la tasa de error se ha estimado un poco más alta que con la PCR, alrededor del 5% (5). La ventaja del FISH frente a la PCR es que al mismo tiempo se pueden detectar aneuploidías, ya que se observan los cromosomas uno a uno. En cambio la PCR nos da tan solo información cualitativa (presencia/ausencia) (6).

Verlinsky y colaboradores aconsejan la realización de ambas técnicas (PCR y FISH) con biopsia de dos blastómeras para así aumentar la fiabilidad de la identificación (7).

LA SELECCIÓN GENÉTICA PRECONCEPCIONAL (SGP)

Como se ha comentado anteriormente, en la SGP lo que se pretende es enriquecer una muestra seminal en espermatozoides con cromosoma sexual X o Y pa-

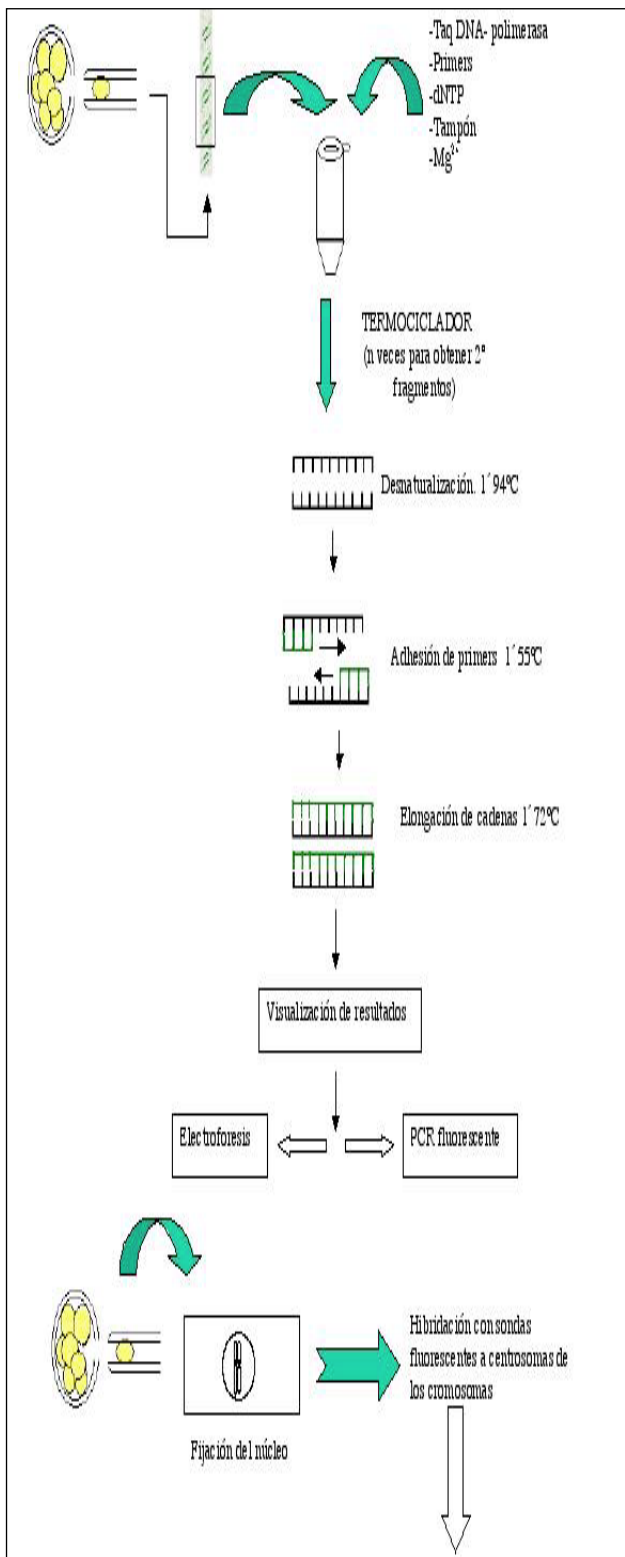


Figura 1

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

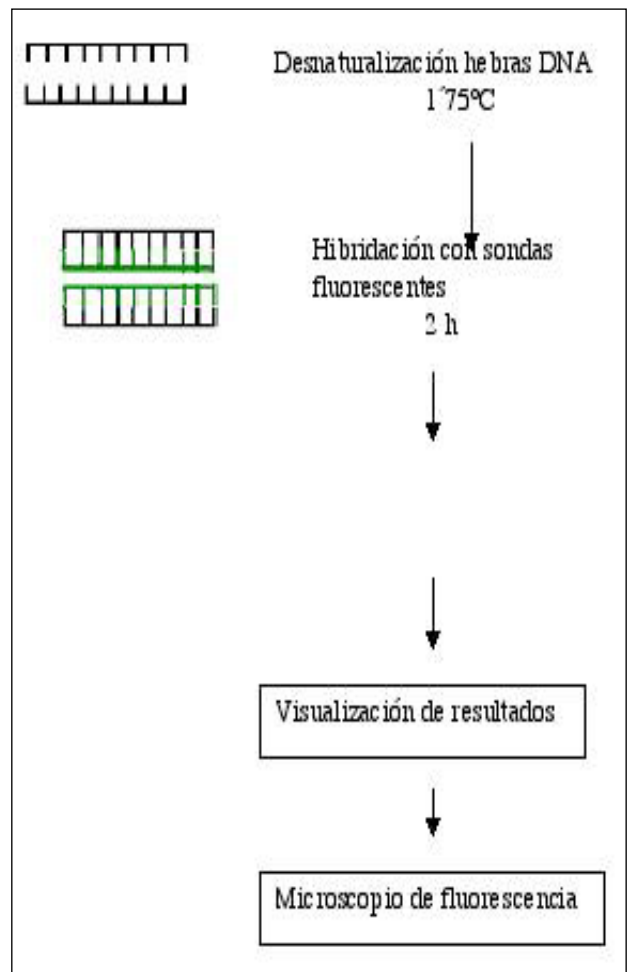


Figura 2

Hibridación "in situ" fluorescente (F.I.S.H)

ra así obtener las mayores probabilidades de tener un descendiente varón o hembra.

La idea surgió ya hacia los años 80 cuando las TRA comenzaron a dar sus frutos y se parecía que iban naciendo más varones que hembras (8). Hoy en día se sabe que la diferencias no son significativas, pero se postuló que el método de capacitación de la muestra seminal podría estar seleccionando los espermatozoides. De este modo, son muchas las publicaciones y técnicas al respecto (9). Algunas de las técnicas, hoy en desuso, que se propusieron son:

Swim-up.- Según el tiempo de centrifugado de la muestra, se pensaba que se podían enriquecer las muestras en uno u otro sentido. De Jonge y colaboradores (10) hicieron un estudio con muestras control (no capacitadas) y muestras centrifugadas a diferentes tiempos (15, 30 45 y 60 minutos). Mediante FISH se

determinaron los porcentajes de espermatozoides de cada tipo y encontraron que no había diferencias significativas entre los grupos. Lógicamente, encontraron que a mayor tiempo de centrifugado había diferencias significativas en cuanto a la eliminación de espermatozoides aneuploides. Resultados similares fueron publicados previamente por otro grupo (11).

Gradientes de Albúmina (de 2 o 3 fases).- se pensaba que enriquecían las muestras en espermatozoides Y. Flaherty y colaboradores realizaron un estudio mediante FISH y demostraron que no (12, 14).

Gradientes de Percoll.- Haciendo gradientes de 12 fases (desde el 25 al 85%) se enriquece la muestra en espermatozoides X según Wang y colaboradores (13), pero la diferencia no es lo suficientemente grande como para utilizarlo en SGP, sobretodo cuando lo que se pretende es evitar una enfermedad ligada al sexo. Dinnen y colaboradores, no encontraron diferencias en cuanto a la proporción de espermatozoides X e Y realizando los gradientes de Percoll (15).

Filtros Sephadex.- se usaban para la selección de espermatozoides Y, con diferencias no significativas según Vidal y colaboradores (16).

Métodos inmunomagnéticos.- lo llevaron a cabo Sills y colaboradores (17). Se separan los espermatozoides utilizando anticuerpos monoclonales frente al antígeno de superficie H-Y. La muestra se incubaba con los anticuerpos unidos a bolas paramagnéticas y posteriormente los espermatozoides son separados en un campo magnético. El inconveniente es que los autores vieron que el 49,0% de los espermatozoides Y no expresan este antígeno.

La técnica que en la actualidad se utiliza para SGP es la separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo(14).

CITOMETRÍA DE FLUJO PARA SGP

La técnica se basa en la separación de los espermatozoides según su diferencia en la cantidad de DNA total. En la especie humana concretamente, el espermatozoides X contiene un 2,8% más DNA que el Y (18).

La primera separación en humanos tuvo lugar en el año 1993 por Johnson y colaboradores (19). Entre otros, este grupo ya tenía experiencia previa en el enriquecimiento de muestras seminales en animales como el conejo (20), cerdo (19, 20, 21, 22), ganado ovino (20) y ganado bovino (20, 23). Las tasas de éxito publicadas por estos autores en la separación oscilan

entre el 80 y el 97%, dependiendo de la especie animal, ya que las características de los espermatozoides (tanto morfología como grado de teratozoospermia o diferencia de DNA entre espermatozoides X eY) son cruciales para el proceso.

En Abril del año 1995 se publicó la primera gestación conseguida con esta técnica (24), aunque no fue hasta agosto del 1996 cuando nació la primera niña. En Enero de 2002 había publicadas 419 gestaciones con 259 niños nacidos.

Actualmente el centro con mayor experiencia en el sexado de espermatozoides es el Genetics and IVF Institute en Fairfax (USA), donde otros centros de reproducción asistida pueden enviar muestras seminales para obtener muestras sexadas.

Bases de la técnica

La muestra seminal se tiñe con una solución de Hoechst 33342 (bisbenzimidida), que es un fluorocromo que se une de manera no covalente a los pares de bases A-T y tiene una absorción máxima a 340 nm. Este espectro es diferente del de absorción del DNA (260 nm) por lo que la posterior excitación no afectaría a su estructura. En el citómetro, se detecta la fluorescencia emitida por cada espermatozoide con un filtro de 400 nm de longitud de onda y los espermatozoides seleccionados son recogidos mediante un sorter. Una parte de la muestra obtenida finalmente se analiza mediante FISH, y la otra es congelada para su posterior utilización en TRA, bien inseminación artificial (IA) o fecundación "in vitro" (FIV) (25).

Los resultados que se obtienen con el FISH es que el 85% de los espermatozoides seleccionados son X (26). Las tasas de gestación en TRA son de un 10,6% en IA, y un 21,2% en FIV. Si nos referimos a los niños nacidos, el 92,9% de los nacimientos fueron niñas.

La principal crítica que ha recibido esta técnica es el uso de bisbenzimidida como fluorocromo, ya que es un agente potencialmente mutagénico. Fugger y colaboradores (27) alegan que se ha visto que este producto no afecta al gen de la β -globina. En cambio, Gardiner-Garden (28) propone el estudio en otros genes, ya que el 15% del DNA de los espermatozoides no se compacta en protaminas, y esos genes estarían más desprotegidos frente a productos mutagénicos. Los autores que llevan a cabo esta técnica responden con las evidencias clínicas de niños nacidos sanos, como ocurrió en su día con el comienzo de la aplicación de la microinyección de espermatozoides, tan aceptada y generalizada en la actualidad.

Limitaciones de la técnica

En primer lugar, las tasas de gestación obtenidas son bastante bajas, por lo que la paciente ideal para someterse a esta técnica debería ser joven y sin problemas de esterilidad. Además, la recuperación espermática tras el sexado es muy baja: entre el 0,6 y el 1,2%, por lo que la muestra seminal inicial debería tener un recuento bastante alto. Esta baja recuperación se debe a que muchas células son eliminadas por morfología anómala que afecta al posicionamiento de la célula en el aparato y a la pequeña diferencia en el DNA total (sólo un 2,8%). Por ello, la mayoría de los casos deberían concluir con una FIV con microinyección de espermatozoides, en lugar de IA, a pesar de que se publicó que no existen diferencias significativas en cuanto a las tasas de gestación si se realiza una IA con 200000 o 200 millones de espermatozoides por mililitro (29).

CONCLUSIONES

En la actualidad se dispone de la tecnología suficiente, como para poder seleccionar el sexo de la descendencia con una fiabilidad más que aceptable. El uso de estos métodos se debe aplicar bien con fines terapéuticos o no terapéuticos usados de forma racional, pero siempre bajo el amparo de la Ley vigente en cada País.

Las tasas de gestación cuando se realiza un sexado bien de gametos o de embriones continúan siendo bajas, aunque en la actualidad este tipo de técnicas suponen una esperanza para los padres susceptibles de transmitir a sus descendientes una enfermedad ligada al sexo.

Hoy en día, la evidencia que tenemos de que estas técnicas funcionan, es el nacimiento de niños sanos, pero el tiempo será el que nos asegure su real funcionamiento, al igual que ocurre con otro tipo de técnicas hoy tan cotidianas para los que nos dedicamos a la Reproducción, como el ICSI. No debemos olvidar que tanto gametos como embriones, están sometidos a procesos bastante traumáticos.

El principal problema con el que topan las parejas que se someten a estas técnicas, es el coste, ya que además del sexado de los embriones o los espermatozoides, la pareja debe costear el tratamiento de fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Malpani A, Malpani A, Modi D.:** Preimplantation sex selection for family balancing in India. *Hum Reprod* 2002 Jan; 17(1):11-2.
2. **Reubinoff BE, Schenker JG.:** New advances in sex selection. *Fertil Steril* 1996 Sep; 66 (3):343-50.

3. **Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM.:** Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990 Apr 19; 344(6268):768-70.
4. **Veiga A, Santalo J, Vidal F, Calderon G, Gimenez C, Boada M, Egozcue J, Barri PN.:** Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection. *Hum Reprod* 1994 Nov; 9(11):2156-9.
5. **Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH.:** Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994 Apr; 9(4):721-4.
6. **Munne S, Tang YX, Grifo J, Rosenwaks Z, Cohen J.:** Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1994 Jan; 61(1):111-7.
7. **Verlinsky Y, Rechitsky S, Freidline M, Cieslak J, Strom C, Lifchez A.:** Birth of a healthy girl after preimplantation gender determination using a combination of polymerase chain reaction and fluorescent in situ hybridization analysis. *Fertil Steril* 1996 Feb; 65(2):358-60.
8. **Tarin JJ, Bernabeu R, Babiera A, Bonada M, Cano A.:** Sex selection may be inadvertently performed in in-vitro fertilization-embryo transfer programmes. *Hum Reprod* 1995 Nov; 10(11):2992-8.
9. **Gawecka-Szczygiel M, Kurpisz M.:** X- and Y- chromosome-bearing sperm selection and detection methods. A review. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; 33(4):219-27.
10. **De Jonge CJ, Flaherty SP, Barnes AM, Swann NJ, Matthews CD.:** Failure of multitube sperm swim-up for sex preselection. *Fertil Steril* 1997 Jun; 67(6):1109-14.
11. **Han TL, Flaherty SP, Ford JH, Matthews CD.:** Detection of X- and Y- bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. *Fertil Steril* 1993 Dec; 60(6):1046-51.
12. **Flaherty SP, Michalowska J, Swann NJ, Dmowski WP, Matthews CD, Aitken RJ.:** Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997 May; 12(5):938-42.
13. **Wang HX, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD.:** Assessment of the separation of X- and Y-bearing sperm on albumin gradients using double-label fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1994 Dec; 62(6):1286-8.
14. **Flaherty SP, Matthews CD.:** Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Mol Human Reprod* 1996 Dec; 2(12):937-42.

15. **Dinnen T, Nolan A, Harrington J, Greer A, Kennedy R, Houghton JA.:** Fluorescence in situ hybridization studies on the sex chromosome constitution of human sperm. *Arch Androl* 1997 Nov-Dec; 39(3):217-22.
16. **Vidal F, Moragas M, Catala V, Torello MJ, Santalo J, Calderon G, Jiménez C, Barri PN, Egozcue J, Veiga A.:** Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993 Oct; 8(10):1740-3.
17. **Sills ES, Kirman I, Colombero LT, Hariprashad J, Rosenwaks Z, Palermo GD.:** H-Y antigen expression patterns in human X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa. *Am J Reprod Immunol* 1998 Jul; 40(1):43-7.
18. **Cran DG, Johnson LA.:** The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa. *Hum Reprod Update* 1996 Jul-Aug; 2(4):355-63.
19. **Johnson LA, Welch GR, Keyvanfar K, Dorfmann A, Fugger EF, Schulman JD.:** Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. *Hum Reprod* 1993 Oct; 8(10):1733-9.
20. **Johnson LA.:** Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4):893-903.
21. **Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Boquest AC, Cantley TC, Rieke A, Day BN.:** Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 1998 Nov; 50(7):981-8.
22. **Johnson LA.:** Advances in gender preselection in swine. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 52:255-66.
23. **Hamano K, Li X, Qian XQ, Funauchi K, Furudate M, Minato Y.:** Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol Reprod* 1999 May; 60(5):1194-7.
24. **Levinson G, Keyvanfar K, Wu JC, Fugger EF, Fields RA, Harton GL, Palmer FT, Sisson ME, Starr KM, Dennison-Lagos L, et al.:** DNA-based X-enriched sperm preparation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease. *Hum Reprod* 1995 Apr; 10(4):979-82.
25. **Fugger EF.:** Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. *Theriogenology* 1999 Dec; 52(8):1435-40.
26. **Vidal F, Fugger EF, Blanco J, Keyvanfar K, Catala V, Norton M, Hazelrigg WB, Black SH, Levinson G, Egozcue J, Schulman JD.:** Efficiency of MicroSort flow cytometry for producing sperm populations enriched in X- or Y-chromosome haplotypes: a blind trial assessed by double and triple colour fluorescent in-situ hybridisation. *Hum Reprod* 1998 Feb; 13(2):308-12.
27. **Fugger EF, Black SH, Keyvanfar K, Schulman JD.:** Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 Sep; 13(9):2367-70.
28. **Gardiner-Garden M.:** Techniques for sorting X and Y spermatozoa may adversely affect histone-associated regions in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1999 May; 14(5):1403-4.
29. **Cressman BE, Pace-Owens S, Pliego JF, Wincek TJ, Kuehl TJ.:** Effect of sperm dose on pregnancy rate from intrauterine insemination: a retrospective analysis. *Tex Med* 1996 Dec; 92(12):74-9.