

SESSAGGIO EMBRIONALE NELLA SPECIE BOVINA MEDIANTE PCR E SUCCESSIVO CONGELAMENTO E TRAPIANTO: RISULTATI PRELIMINARI.

Ambrosi V., Morini G., Parmigiani E., Bigliardi E.

Premessa

Nel campo delle biotecnologie della riproduzione il sessaggio degli embrioni bovini riveste un ruolo di grande interesse per le varie applicazioni che questa tecnica trova in campo zootecnico.

Infatti è possibile conoscere il sesso dell'embrione, con una accuratezza prossima al 100% (Bredbacka P. et al.,1995), già all'età di 7 giorni mediante la tecnica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguita dalla migrazione elettroforetica su gel di agarosio.

Come è noto il moderno allevamento bovino improntato sulla produzione di latte ha come obiettivo una produzione di vitelli di sesso femminile tra i quali scegliere i soggetti migliori per la propria rimonta; in questo contesto la nascita di vitelli maschi di razze ad elevata attitudine lattifera non è certamente auspicabile.

Inoltre consente di ottenere vitelli del genotipo prescelto e quindi di diminuire gli intervalli generazionali ed i costi per l'incremento genetico; trova anche applicazione nella prevenzione di malattie legate al sesso.

Questa tecnica, che trova il suo impiego in caso di *embryo transfer* e nella produzione in vitro di embrioni, permette l'impegno nella gestazione dei soli animali che hanno ricevuto gli embrioni del sesso desiderato lasciando così a disposizione dell'allevatore un numero maggiore di animali da ingravidare mediante fecondazione artificiale o come riceventi di altri embrioni.

In passato sono stati numerosi i tentativi di mettere a punto tecniche di biopsia affidabili che al tempo stesso associassero caratteristiche di praticità e scarsa invasività e tra queste le più diffuse sono la tecnica di sezione con microbisturi (*Foto 1*) e quella mediante microaspirazione (*Foto 2*) (Chrenek et al.,2001).

Tra le due la seconda è quella sicuramente meno invasiva (asportazione di 1 blastomero) e data la piccola apertura effettuata nella zona pellucida è maggiormente compatibile con le tecniche di congelamento standard; la seconda asporta un numero di blastomeri superiore (4-8) e prevede la perdita della zona pellucida ma consente di effettuare la biopsia in tempi più brevi ed a costi inferiori, l'efficienza della diagnosi è superiore grazie al numero di blastomeri prelevati e presenta la caratteristica di essere agevolmente applicabile in campo, dal momento che il micromanipolatore ha dimensioni ridotte e quindi facile da trasportare (*Foto 3 e 4*).

L'asportazione di un numero limitato di blastomeri è una condizione auspicabile per salvaguardare le future capacità di sviluppo dell'embrione, così come la rapidità nell'effettuare la biopsia per ridurre al minimo i tempi di contatto tra embrione e medium; in questo modo si evitano stress che potrebbero essere fatali al successivo sviluppo dell'embrione.

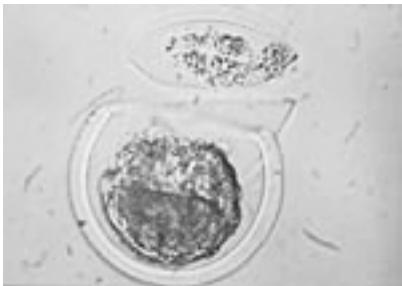


Foto 1: biopsia embrionale effettuata mediante microbisturi. In questo caso l'embrione si trova allo stadio di blastocisti ed i blastomeri provengono dal solo trofoblasto.

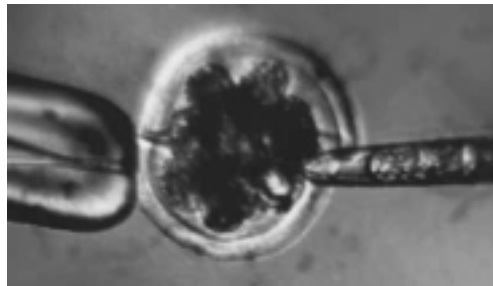


Foto 2: biopsia effettuata mediante aspirazione su un embrione allo stadio di morula (in questo caso precoce).



Foto 3: micromanipolatore per biopsia mediante microbisturi.



Foto 4: micromanipolatre per biopsia mediante aspirazione.

Con un procedimento molto simile alla sezione della biopsia è anche possibile ottenere gemelli omozigoti a partire da un unico embrione (*splitting*) nell'ottica di una ottimizzazione dei trapianti embrionali; inoltre è pure possibile associare le due tecniche con risultati apprezzabili (Bredbacka P. et al., 1994).

Per quanto riguarda l'individuazione del cromosoma Y sono stati sperimentati diversi metodi come l'utilizzo di anticorpi per la ricerca di specifici antigeni maschili, il cariotipo, l'individuazione di differenze metaboliche tra embrioni maschi e femmine (Shea B.F., 1999) e più recentemente l'analisi del DNA. È proprio quest'ultimo tipo di analisi, in particolare la reazione di polimerizzazione a catena (PCR), l'unico metodo che fino ad oggi garantisce un saggio affidabile e tempi di applicazione ridotti, compatibili con il trapianto dell'embrione fresco o il suo congelamento.

Materiali e metodi

1. CARATTERISTICHE DEGLI EMBRIONI

Per convenzione internazionale l'espianto embrionale si effettua il 7° giorno dopo la fecondazione, quando gli embrioni vanno dallo stadio di morula a quello di

blastocisti espanse; ognuno di questi stadi di sviluppo è compatibile con il sessaggio.

Un'altra condizione essenziale è che gli embrioni siano di prima qualità perché diversamente mal sopporterebbero lo stress della biopsia (Bredbacka P. et al.,1994).

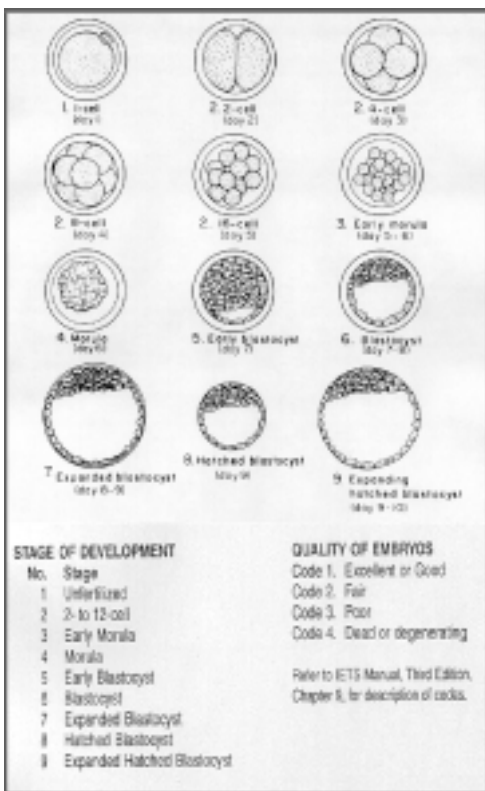
Gli Autori hanno sessato e congelato 126 embrioni di cui 36 erano allo stadio di morula, 23 allo stadio di blastocisti iniziali, 42 blastocisti e 25 blastocisti espanse (Tab. 1), classificate secondo le direttive I.E.T.S. (*International Emryo Transfer Society*) (Fig. 1).

Ad oggi 42 di questi sono stati trapiantati.

Tab.1: numero e qualità degli embrioni sottoposti a sessaggio.

Stadio di sviluppo	Totale	Qualità 1 n° (%)	Qualità 2 n° (%)	Qualità 3 n° (%)
Morule (4)	36	27 (75)	7 (19,4)	2 (5,5)
Blastocisti iniziali (5)	23	15 (65,2)	6 (26)	2 (8,6)
Blastocisti (6)	42	32 (76,2)	6 (14,2)	4 (9,5)
Blastocisti espanse (7)	25	25 (100)	-	-

Fig. 1: Classificazione degli embrioni bovini secondo le direttive I.E.T.S. (il primo numero è indicativo dello stadio di sviluppo).



2. CARATTERISTICHE DEI MATERIALI

Le piastre sulle quali si effettua la biopsia sono costituite da polistirene che, essendo caricato positivamente, favorisce l'attrazione elettrostatica tra il fondo e l'embrione, che in questo modo vi può aderire senza scivolare sotto l'azione della lama.

Gli embrioni, dopo la ricerca nel liquido di lavaggio filtrato e la loro selezione, sostano in una soluzione chiamata *holding* nella quale possono restare alcune ore ad una temperatura compresa tra i 15 e 25 °C; essa consiste in DMPBS (*Dulbecco Modified Phosphate Buffered Saline*), e contiene, tra gli altri, anche sali di calcio e magnesio, sodio piruvato ed antibiotici, quali penicillina e streptomina.

La biopsia è stata effettuata mediante microsezione in microgocce da 50 µl su piastre da 60 mm previo attento assetto del microbisturi; le microgocce sono costituite essenzialmente da un medium, che chiameremo *splitting medium*, a base di DMPBS ulteriormente modificata. Una caratteristica fondamentale è che deve essere priva di proteine in modo da favorire l'adesione dell'embrione al fondo della piastra e contenere piccole quantità di sali di calcio e magnesio per favorire la separazione dei blastomeri sotto la pressione della lama. Dal momento che non si tratta di una soluzione ideale per l'embrione, il tempo di contatto con questa soluzione, compreso risciacquo e biopsia, non deve superare i 15 minuti; infatti subito dopo aver effettuato la sezione si preleva l'embrione, ormai privo di zona pellucida, e lo si sposta nell'*holding*.

Anche i blastomeri vengono separati dalla zona pellucida (essa potrebbe alterare i risultati nel caso in cui fossero presenti sulla sua superficie frammenti di DNA maschile provenienti dagli spermatozoi) e spostati nel *tube DNA-free* da PCR.

Per poter prelevare dalla microgoccia le poche cellule della biopsia che per effetto dell'attrazione con la piastra aderiscono immediatamente sul fondo di questa, è necessario utilizzare un altro tipo di soluzione, per brevità chiamata *retrieval medium*, che neutralizza le cariche elettrostatiche; anch'essa tra l'altro è priva di proteine che potrebbero contaminare la biopsia con DNA estraneo, ha la stessa densità dello *splitting medium* e contiene polivinilalcol (PVA) come surfattante.

È assolutamente necessario sostituire il puntale ad ogni biopsia e lavare la lama del microbisturi in etanolo al 70% per evitare contaminazioni, che si rivelano essere uno dei maggiori problemi da affrontare con questa metodica.

La biopsia deve asportare al massimo il 10% delle cellule dell'embrione; nel caso di una blastocisti esse devono assolutamente provenire dal trofoblasto in modo da lasciare intatto il bottone embrionale. Il blastocite collassato si riformerà in poche ore (Herr C.M. et al., 1991).

Nel caso in cui si volesse associare lo *splitting* al sessaggio, è consigliabile dividere l'embrione in modo da ottenere una porzione di dimensioni maggiori dalla quale poi asportare le cellule necessarie per la biopsia (Bredbacka P. et al., 1994).

3. AMPLIFICAZIONE DEL DNA

Limitatamente alle fasi di amplificazione del DNA e della migrazione elettroforetica su gel di agarosio, il procedimento richiede circa 1 ora e 30 minuti, suddivisi in 65 minuti per la PCR ed altri 20 minuti per la migrazione elettroforetica; il ciclatore e la strumentazione per effettuare l'elettroforesi devono essere nettamente separati dalla stanza in cui si effettua la biopsia per evitare che in questa si accumulino

elevate concentrazioni di DNA amplificato che è frequentemente causa di contaminazioni (Herr C.M. et al., 1991).

I maggiori problemi da affrontare sono quelli dovuti all'accidentale contaminazione del campione con DNA esogeno, proveniente da spermatozoi adesi alla membrana pellucida o da embrioni precedentemente micromanipolati; un altro problema è la perdita della biopsia durante il passaggio nel *tube* poiché costituita da poche cellule che possono aderire al puntale oppure alla parete del *tube*.

Inoltre talvolta possiamo incorrere in reazioni la cui lettura è di difficile interpretazione, nel senso che la banda specifica che indica la presenza del cromosoma Y è molto debole o poco definita e non permette di fare una diagnosi certa.

4. MIX DI REAZIONE

Il mix di reazione è una soluzione costituita dai *primers* (AB Technology – Washington, USA), dai desossinucleotidi trifosfati, dall'enzima *Taq* DNA Polimerasi e da una soluzione tampone.

I *primers* riconoscono sequenze specifiche del DNA e si legano ad esse indicando il punto dal quale l'enzima *Taq* DNA Polimerasi dovrà iniziare l'amplificazione; più in particolare essi sono oligonucleotidi specifici orientati in modo che la sintesi della catena bersaglio proceda nella regione compresa tra i due *primers* con andamento antiparallelo.

Sono presenti due *primers* che riconoscono sequenze caratteristiche del DNA bovino maschile ed altri due *primers* che riconoscono le sequenze del DNA autosomico bovino.

L'enzima *Taq* DNA Polimerasi, purificato ed isolato da un batterio termofilo, il *Thermus aquaticus*, ha l'importante caratteristica di esercitare la propria azione solo ad alte temperature, tra 70 e 80°C, e per tempi limitati.

Il DNA è reso disponibile all'attacco dei *primers* grazie alla rottura delle membrane dei blastomeri in seguito al congelamento dei campioni immersi direttamente in azoto liquido.

Previa denaturazione del DNA alla temperatura di 95°C, i *primers* affiancano la sequenza bersaglio da amplificare alla temperatura di 64°C e forniscono l'ossidrilico 3' di innesco dal quale, alla temperatura di 72°C, l'enzima *Taq* DNA Polimerasi inizierà l'attività di estensione.

Ogni ciclo si compone quindi di tre temperature:

Temperatura di denaturazione: 95°C;

Temperatura di ibridazione: 64°C;

Temperatura di estensione: 72°C.

Il ciclo viene ripetuto 33 volte ed il risultato è un accumulo esponenziale del frammento bersaglio.

Il ciclatore termina con una estensione finale a 72°C per 2 minuti, quindi la reazione viene fermata raffreddando i campioni a 4°C.

5. ALLESTIMENTO DEI TUBES

Per ogni embrione viene allestito un *tube* con 8 µl di *Cresol Red*, una soluzione di colore fucsia che in presenza del mix di reazione vira assumendo una colorazione più scura, a testimoniare l'avvenuta aggiunta dei *primers*.

Per ogni ciclo di sessaggio si allestiscono altri tre 3 *tubes* contenenti ciascuno 2 μ l di soluzioni di controllo, costituite da linfociti isolati e diluiti ad una concentrazione che sia simile a quella della biopsia (quindi circa otto cellule) in modo da verificare che l'amplificatore ed i *primers* abbiano agito correttamente. Di questi tre *tubes*, due contengono i controlli maschio e femmina ed uno il controllo negativo, cioè privo di cellule, dal quale si può capire se in qualche modo le soluzioni sono state contaminate.

Dopo lo scongelamento dei *tubes* contenenti la biopsia, si aggiungono 12 μ l di mix di reazione e si amplifica per 65 minuti.

6. MIGRAZIONE ELETTROFORETICA

Al termine della fase di amplificazione, 20 μ l di questa soluzione sono collocati nei pozzetti del foglio di gel al 3% di agarosio.

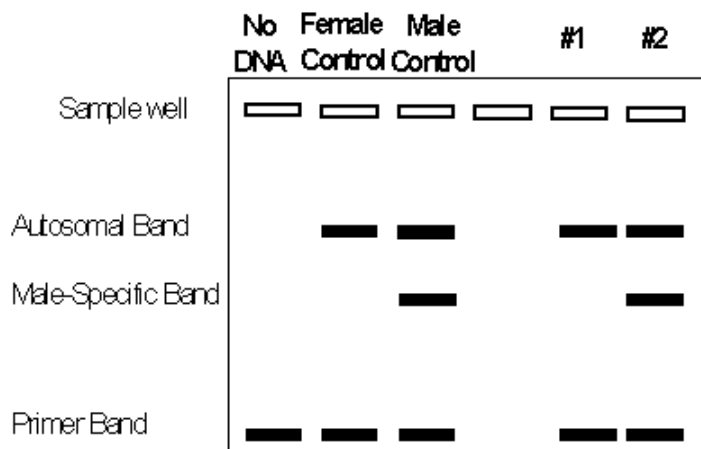
La migrazione avviene ad un voltaggio costante di 140 volt e termina dopo 20 minuti, trascorsi i quali si leggono i risultati con un transilluminatore a raggi UV.

La presenza della banda specifica corrispondente all'avvenuta amplificazione del DNA maschile (*male-specific band*-250 bp) indica chiaramente il sesso maschile del soggetto in esame (Fig. 3 e Foto 5).

La banda di controllo specifica del DNA bovino (*autosomal band*-360 bp) indica che il campione è presente, così come quella dei *primers* (*primer band*-40 bp) indica la presenza di quest'ultimi; se le operazioni sono state tutte eseguite correttamente, queste ultime due bande sono sempre presenti e indicano che il soggetto è di sesso femminile, data l'assenza della *male-specific band*.

Per quanto riguarda la lunghezza dei prodotti della PCR, essa è variabile a seconda del tipo di *primers* utilizzati. Nel nostro caso si tratta di miscele di reazione conservate in azoto liquido presenti in commercio e pronte all'uso (Ab Technology – Washington, USA).

Fig. 3: rappresentazione schematica dei risultati dopo migrazione elettroforetica. A partire da sinistra sono indicate le prime tre bande di controllo, un pozzetto di separazione senza campione, un soggetto femmina ed uno maschio.



7. CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO DEGLI EMBRIONI

Durante il periodo in attesa dei risultati gli Autori hanno proceduto al congelamento in glicole etilenico (*metodo one-step*) degli embrioni micromanipolati.

Gli embrioni sono stati caricati in *paillettes* da 0,25 ml con *holding* e glicole etilenico 1,5 M, lasciati a temperatura ambiente per 5 minuti e quindi posti nel congelatore a $-6,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dopo un minuto è stata indotta la cristallizzazione (*seeding*) mediante contatto della *paillette* con un corpo metallico precedentemente immerso in azoto liquido ed abbassata gradualmente la temperatura fino a $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un *cooling rate* di $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Dopo un'attesa di 10 minuti a questa temperatura le *paillettes* sono state immerse direttamente in azoto liquido e conservate fino al momento del trapianto.

Gli embrioni sono stati scongelati in aria per 7 secondi e in acqua tiepida a 28°C per ulteriori 20 secondi, quindi trasferiti nelle bovine riceventi.

8. BOVINE RICEVENTI

Le 42 bovine riceventi gli embrioni sessati erano di età compresa tra i 14 ed i 17 mesi.

Sono state sincronizzate mediante somministrazione di $10\text{ }\mu\text{g}$ di GnRh (giorno zero) e $300\text{ }\mu\text{g}$ di Cloprostenolo Destrogiro dopo 7 giorni. A 72 ore dopo l'ultima somministrazione le bovine riceventi hanno manifestato atteggiamenti estrali e 7 giorni dopo sono state visitate attraverso esplorazione rettale per valutarne l'idoneità al trapianto. Nella medesima giornata del trapianto sono stati somministrate 1.000 U.I. di hCG a ciascuna ricevente (Parmigiani et al., 2001).

La diagnosi di gravidanza è stata effettuata dal 55° al 65° giorno dal trapianto mediante esplorazione rettale. In tale contesto si è poi proceduto al sessaggio fetale con metodi ultrasonografici utilizzando una sonda lineare da 5 MHz.

Risultati

Dopo aver verificato il corretto funzionamento del mix di reazione e l'assenza di contaminazioni mediante i pozzetti di controllo, le letture dei risultati sono state fotografate con pellicola istantanea per una più agevole consultazione nel breve e lungo termine (*Foto 5*).

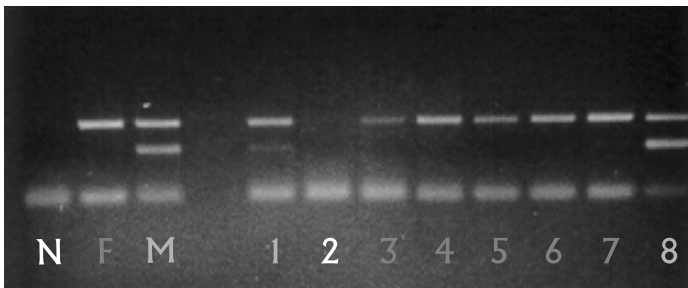


Foto 5: esempio di risultati dopo migrazione elettroforetica. A partire da sinistra troviamo le prime tre bande di controllo quindi un soggetto maschio (n°1), un campione senza biopsia (n°2), 5 soggetti femmina (n°3-4-5-6-7) ed 1 maschio (n°8).

Gli Autori hanno sessato 126 embrioni bovini di stadio e qualità molto diverse tra loro.

Per quanto riguarda gli embrioni allo stadio di morula, 16 di questi erano femmine (44,4%), 14 maschi (38,8%), 3 dubbi (8,3%) e in 3 non era presente la biopsia (8,3%).

Delle 23 blastocisti iniziali 11 erano femmine (47,8%), 7 erano maschi (30,8%), 2 dubbi (8,6%) e 3 senza biopsia (13%); delle 42 blastocisti 20 erano femmine (47,6%), 14 erano maschi (33,3%), 5 dubbi (11,9%) e 3 senza biopsia (7,14%); infine su 25 blastocisti espanse 11 erano femmine (44%), 9 maschi (36%), 3 dubbi (12%) e 2 senza biopsia (8%) (Tab. 2).

Tab. 2: numero e percentuale di embrioni femmine, maschi, dubbi e casi di assenza di biopsia ottenuti in seguito a sessaggio.

Stadio di sviluppo	Totale	Femmine n° (%)	Maschi n° (%)	Dubbi n° (%)	Ass. biopsia n° (%)
Morule	36	16 (44,4)	14 (38,8)	3 (8,3)	3 (8,3)
Blastocisti iniziali	23	11 (47,8)	7 (30,4)	2 (8,6)	3 (13)
Blastocisti	42	20 (47,6)	14 (33,3)	5 (11,9)	3 (7,1)
Blastocisti espanse	25	11 (44)	9 (36)	3 (12)	2 (8)

Di questi 126 embrioni 42 sono stati trapiantati su altrettante riceventi ritenute idonee.

Gli embrioni scelti erano tutti di sesso femminile e di qualità variabile da 1 a 3; lo stadio di sviluppo era anch'esso variabile da blastocisti iniziale a blastocisti espanse (Tab. 3).

Le gravidanze ottenute dalle blastocisti iniziali sono state 2 (18,1%), 4 dalle blastocisti (20%) e 3 dalle blastocisti espanse (27,2%) e tutte erano provenienti da embrioni di qualità 1.

Se riferiamo le percentuali a quest'ultimi embrioni otteniamo il 25% di gravidanze per le blastocisti iniziali, il 26,6% per le blastocisti ed il 27,2% per le blastocisti espanse (Tab. 3).

Tab. 3: gravidanze ottenute in seguito a trapianto di 42 blastocisti di qualità 1,2 e 3, sessate e congelate.

Stadio di sviluppo	Totale Embrioni Trapiantati	Qualità n° (%)	Qualità n° (%)	Qualità n° (%)	Gravidanze n° (%)*	Gravidanze (%)°
Blastocisti iniziali (5)	11	8 (72,7)	2 (18,1)	1 (9)	2 (18,1)	25
Blastocisti (6)	20	15 (75)	3 (15)	2 (10)	4 (20)	26,6
Blastocisti espanse (7)	11	11 (100)	-	-	3 (27,2)	27,2

* i dati si riferiscono al complesso di embrioni di qualità variabile da 1 a 3.

° i dati si riferiscono ai soli embrioni di prima qualità.

Il numero di gravidanze ottenute è stato quindi di 9 su 34 embrioni di prima qualità, pari ad una percentuale media di gravidanza del 26,4%.

La diagnosi ecografia per via transrettale ha confermato i risultati del sesso embrionale.

Discussione e conclusioni

La tecnica del sesso embrionale mediante PCR ed elettroforesi si è mostrata realmente valida nell'affidabilità dei risultati.

Certo è che si tratta di una metodica molto delicata in tutte le sue fasi in particolare per quanto riguarda la presenza o meno della biopsia, dati i volumi estremamente ridotti ed il numero di cellule a disposizione.

Un altro problema non trascurabile è l'attesa durante l'amplificazione e la migrazione elettroforetica, nonché il tempo necessario per la biopsia stessa ed il suo trasferimento: pur richiedendo questo processo circa 5 minuti, se si moltiplica tale dato per il numero degli embrioni, ad esempio 10, si comprende che i tempi si allungano notevolmente.

Le cellule prelevate sembra che non riducano le potenzialità dell'embrione (Shea B.F., 1999) come pure l'assenza della zona pellucida non sembra essere un fattore essenziale per la sopravvivenza al congelamento (Herr C.M. et al., 1991), ma alla luce dei risultati ottenuti dalla nostra esperienza riteniamo che la sua presenza sia in realtà importante nell'offrire una sorta di protezione all'embrione stesso durante il congelamento.

La tecnica, dal sesso al congelamento, presenta non pochi punti critici che concorrono ad una riduzione delle percentuali di gravidanza:

l'esposizione a media comunque non ideali (ad esempio la *splitting solution*);

la pressione esercitata dal microbisturi durante la biopsia si ripercuote negativamente sulla coesione della massa cellulare;

l'assenza della zona pellucida;

esposizione al crioprotettore ed alle basse temperature.

Gli Autori ritengono quindi che il sesso embrionale possa offrire risultati soddisfacenti quando alcuni fattori di stress sono evitati, ad esempio il congelamento.

In base alla nostra esperienza l'utilizzo di embrioni di qualità 2 e 3 non ha portato ad alcuna gravidanza, per cui non se ne consiglia la micromanipolazione ma l'impiego come embrione integro; quando la qualità era ottima le percentuali di gravidanza, seppur basse, si sono mostrate accettabili.

Di notevole interesse sono le applicazioni che potrà offrire la vitrificazione di embrioni micromanipolati, tecnica questa ancora in fase di definizione, ma che promette svolte importanti nel campo della criobiologia.

Infine la determinazione del sesso può essere associata ad una *multiplex PCR* per l'analisi simultanea di altri loci specifici, quali ad esempio la k-caseina, la prolattina o il GH o ancora di geni la cui mutazione è causa di patologie di origine genetica (Chrenek et al., 2001).

Parole chiave: sesso embrionale; bovina; PCR, congelamento embrionale, trapianto embrionale.

Key words: embryo sexing; bovine; PCR, embryo freezing, embryo transfer.

RIASSUNTO – Gli Autori presentano la descrizione della tecnica di sessaggio embrionale mediante sezione con microbisturi; tra le altre tecniche questa presenta molti vantaggi dal punto di vista pratico. La determinazione del sesso dell’embrione si ottiene con l’amplificazione del DNA mediante reazione a catena della polimerasi e migrazione elettroforetica del prodotto della PCR. Al momento attuale gli Autori hanno sessato e congelato mediante metodo one-step (glicole etilenico) 126 embrioni ad uno stadio variabile da morula a blastocisti espansa e di qualità 1, 2 e 3; 42 di questi sono stati trapiantati in manze riceventi idonee con una percentuale di gravidanza media del 26,4% calcolato su embrioni di prima qualità, dal momento che solo questi hanno dato luogo a gravidanze.

SUMMARY – Sexing, freezing and transfer of bovine embryos by PCR and electrophoresis: preliminary results. The Authors describe embryo sexing by microsection and biopsy blade; this technique is more practical than other ones. Predetection of sex is obtained by DNA amplification (PCR) and electrophoresis. At the moment the Authors have sexed and freed by ethylen glycol 126 embryos between morula and expanded blastocysts and quality 1, 2 and 3; 42 of these ones are transferred to suitable heifers and average pregnancy rate was 26,4% in relation with quality 1 embryos, because only these gave pregnancy.

Bibliografia

- Chrenek, Boulanger L., Heyman Y., Uhrin P., Laurinicik J., Bulla J., Renard J.-P. *Sexing and multiple genotype analysis from a singlecell of bovine embryo* Theriogenology 55: 1071-1081, 2001
- Herr C.M., Reed K.C. *Micromanipulation of bovine embryos for sex determination* Theriogenology 35(1): 45-54, 1991
- Bredbacka P., Kamkaanpää A., Peippo J. *PCR sexing of bovine embryos: a simplified protocol* Theriogenology 44: 167-176, 1995
- Bredbacka P., Velmala R., Peippo J., Bredbacka K. *Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryos* Theriogenology 41: 1023-1031, 1994
- Shea B.F. *Determining the sex of bovine embryos using Polymerase Chain Reaction results: a six-year retrospective study* Theriogenology 51: 841-854, 1999
- Parmigiani E., Bigliardi E., Ambrosi v., Morini G. *Efficienza riproduttiva di riceventi trattate con hCG al momento del trapianto embrionale* Atti S.I.S.VET volume LV, 2001.