

AVANCES EN LA PRESELECCION DEL SEXO

J.M. Vázquez, I. Parrilla , J. Roca, C. Cuello, M.A. Gil y E. Martínez
Dpto. Medicina y Cirugía Animal (Reproducción y Obstetricia)
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia. Spain
e-mail: vazquez@um.es

1.- Introducción.

Poder determinar el sexo de la descendencia antes de la concepción, tanto en animales domésticos como en la especie humana, es una idea que ha ocupado la mente del hombre desde hace miles de años. Los primeros intentos realizados en este sentido se describen ya en la época de los antiguos filósofos griegos, y estaban basados, como norma general, en la mitología y en supersticiones y creencias populares. Aún a finales del siglo XVIII, todavía existía la firme creencia de que la situación anatómica (lado izquierdo o derecho) de los testículos o los ovarios daba origen a esta diferencia de sexo. Las primeras evidencias científicas convincentes sobre la determinación sexual del individuo llegan en el siglo XX con el descubrimiento de los cromosomas sexuales y del papel principal de los mismos en dicha determinación. A partir de este momento los mayores esfuerzos para controlar el sexo de la descendencia han sido dirigidos siempre a la manipulación in vitro del espermatozoide antes de la fecundación, ya que teniendo en cuenta que el ovocito tiene una dotación cromosómica fija, es el gameto masculino el responsable del sexo del futuro individuo.

2.- Importancia de la predeterminación del sexo de la descendencia

La posibilidad de elegir el sexo de la descendencia, antes de la concepción, es uno de los objetivos mas perseguidos dentro del campo

de la tecnología de la reproducción, ya que supone poder controlar una serie de situaciones, algunas de gran importancia, que de otra manera dependen únicamente del azar. La mejora genética y la optimización de la producción en las explotaciones ganaderas, el control de enfermedades hereditarias ligadas al sexo en la especie humana, o el manejo en cautividad y la recuperación de animales salvajes son algunos de los campos en los cuales la selección del sexo supone una herramienta muy importante. Además, esta tecnología tiene una gran aplicación asociada a otras tecnologías como la transgénesis.

En el caso concreto del ganado porcino, esta técnica tiene un especial interés cuando se dirige a grupos de elevado valor económico y/o genético ya que su aplicación permitiría la planificación para que el sexo de los lechones coincidiera con el sexo deseado. Además, esta técnica sería de gran interés en combinación de otras como la transferencia no quirúrgica de embriones que permitiría la comercialización de embriones de sexo conocido y por consiguiente su introducción en las granjas de un modo seguro.

3.- Métodos para predeterminar el sexo de la descendencia

Realizar la predeterminación del sexo antes de la concepción (preselección del sexo) es el método más rentable para la obtención de descendencia del sexo deseado (Johnson, 2000; Johnson et al., 2005).

Teniendo en cuenta que en la dotación cromosómica del ovocito esta siempre presente el cromosoma X, resulta evidente que la determinación sexual del individuo depende del espermatozoide que fecunde ese ovocito, de tal manera que si el espermatozoide es portador de un cromosoma X, dará lugar a una hembra y si es portador del cromosoma Y a un macho. En la actualidad el método mas exacto, eficiente y potencialmente mas rentable para predeterminar sexo de la descendencia, pasa por la separación de los espermatozoides que cuentan en su dotación cromosómica con el cromosoma X de aquellos

que tienen el cromosoma Y, para ser utilizados en inseminación artificial o fecundación in vitro seguida de transferencia embrionaria (Johnson, 2000). Aunque a simple vista podría parecer que esta separación puede llevarse a cabo mediante estrategias sencillas, el hecho de que las diferencias fenotípicas entre los espermatozoides X y los Y sean mínimas (Seidel, 1999) dificulta sobremanera su identificación y selección.

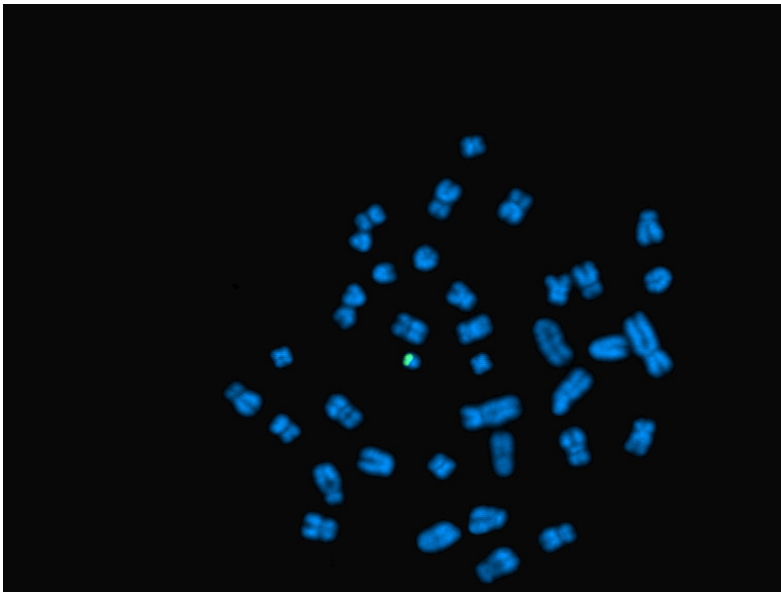


Figura 1.- Cromosomas de linfocitos procedentes de un cerdo macho. La marca fluorescente verde corresponde al cromosoma Y. Como puede observarse, se trata del cromosoma más pequeño.

Se han descrito numerosos procedimientos de separación basados en diferencias en las características físicas como el tamaño, la forma, la densidad o en características de la membrana plasmática entre los espermatozoides X e Y, o incluso en diferencias inmunológicas (Seidel et al., 2003). Sin embargo y debido a que estas diferencias son difíciles de cuantificar con exactitud no se han conseguido resultados de separación satisfactorios.

La existencia de los cromosomas sexuales era conocida desde principios del siglo XX. Sin embargo, la posibilidad de diferenciar los espermatozoides en función del cromosoma sexual que presentan no fue vislumbrada hasta que a finales de los 70 donde se demostró, mediante la observación de los cariotipos, la existencia en los mamíferos de diferencias evidentes en cuanto a la cantidad de ADN presente entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y. Esta diferencia se debe al mayor tamaño que presenta el cromosoma X en relación al Y (Figura 1), y es la única diferencia cuantificable y válida desde un punto de vista científico como base para la separación efectiva de los espermatozoide X e Y (Johnson, 2000).

4.- Separación espermática mediante citometría de flujo en función del contenido en ADN

Predeterminar el sexo de la descendencia, utilizando espermatozoides separados en base a su contenido en ADN, es hoy en día una realidad en porcino, así como en otras especies de mamíferos, incluida la humana, gracias a la citometría de flujo (Johnson, 1989). Esta es hasta el momento la única técnica de separación que ha podido ser reproducida en diferentes laboratorios. Esta técnica se basa en la diferente fluorescencia que emiten los espermatozoides tras la tinción del ADN, diferencia que a su vez se basa en la diferente cantidad de ADN que existe entre el cromosoma X y el cromosoma Y (Pinkel et al., 1982; Seidel y Johnson, 1999).

Estas diferencias no son iguales en todas las especies, siendo de un 7'5% en el caso de las chinchillas y de, solamente, un 2'8% en el caso de los espermatozoides humanos. Las especies de interés productivo se encuentran entre estos límites siendo de un 3'6% en el caso del verraco, 3'7% para caballos, 3'8% para toros y 4'2% para moruecos (Johnson y Welch, 1999). A medida que esta diferencia es mayor, la separación de los espermatozoides X e Y se ejecuta con mayor facilidad (Johnson, 2000)

Durante los últimos 10 años se han realizado importantes avances en el desarrollo de esta técnica relacionados con el conocimiento de la fisiología del espermatozoide separado, evaluación de la mutagenicidad del procedimiento, incremento en el rendimiento de separación, mejora de los medios de recogida que aumentan la viabilidad y supervivencia del espermatozoide, ampliación de la resolución de espermatozoides X e Y, etc (revisado por Vazquez y cols, 2001 y Johnson y cols, 2005).

5.- Adaptación de los citómetros de flujo para separación espermática

El análisis del contenido de ADN de los espermatozoides, de la mayoría de los mamíferos domésticos, mediante citometría de flujo resulta más complicado que en otros tipos celulares debido al elevado grado de compactación de la cromatina y a la morfología plana que presenta la cabeza espermática (Garner, 2001).

Estas propiedades determinan una gran variabilidad en las señales emitidas por los espermatozoides teñidos con determinados fluoró cromos y excitados por el impacto del láser, dando lugar a distribuciones de fluorescencia irregulares que se corresponden con coeficientes de variación elevados (superiores al 5%). En el año 1982, Pinkel y cols. demostraron que las poblaciones de espermatozoides X e Y presentes en los eyaculados de diferentes especies de mamíferos domésticos podían ser identificadas utilizando un citómetro de flujo capaz de controlar la posición de los espermatozoides durante el análisis, obviando así las dificultades descritas anteriormente. Las distribuciones de fluorescencia obtenidas presentaron una mayor definición, permitiendo la identificación de los espermatozoides X e Y presentes en una determinada muestra.

Para ello, hubo que realizar una serie de modificaciones sobre un citómetro separador (cell sorter) estándar. En primer lugar se sustituyó el

detector de luz frontal (0° respecto al impacto del láser) por un detector de fluorescencia. Teniendo en cuenta que la variabilidad en las señales de fluorescencia es debida principalmente a la posición del espermatozoide en el momento del análisis, la incorporación de este detector resultó básica para la identificación y el análisis únicamente de aquellas señales validas correspondientes a los espermatozoides que presentan una posición correcta. En segundo lugar, se modificó el extremo final de la aguja de inyección de muestra, dándole una forma biselada en lugar de cilíndrica como la que incorporan los citómetros estándar. La presencia del bisel determinó que el chorro de muestra adquiriera una forma plana y estrecha, haciendo que un elevado numero de espermatozoides presentaran la orientación adecuada en el momento del análisis, con su lado plano de frente al impacto del láser y al detector frontal (0°) quedando el perfil dirigido hacia al detector de fluorescencia lateral (90°) (Figura 2)

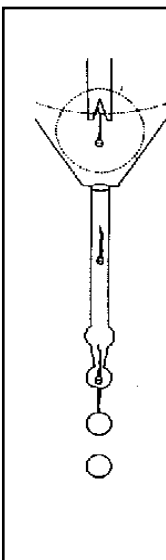
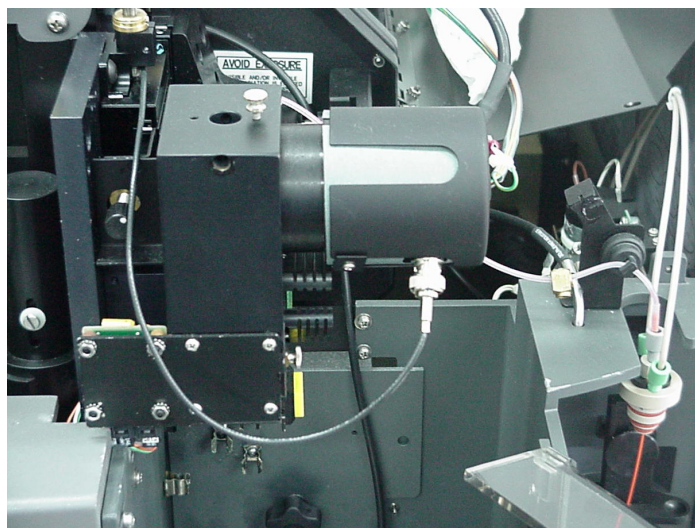


Figura 2.- La principales modificaciones en los citómetros de flujo para poder establecer una discriminación entre las poblaciones que corresponden a espermatozoides X e Y corresponden a la

colocación de un detector de fluorescencia frontal (izquierda) y una aguja biselada para incrementar la población de espermatozoides orientados (izquierda).

Las señales emitidas lateralmente (90°) por los espermatozoides orientados correctamente, presentaban una intensidad mayor de fluorescencia debido a que provenían del perfil celular, mientras que aquellos espermatozoides en una posición inadecuada daban lugar a señales laterales de fluorescencia menos intensas. El histograma originado por esta diferencia en la intensidad de las señales emitidas, permitía la identificación de los espermatozoides mal orientados haciendo posible su eliminación de los análisis (Figura 3).

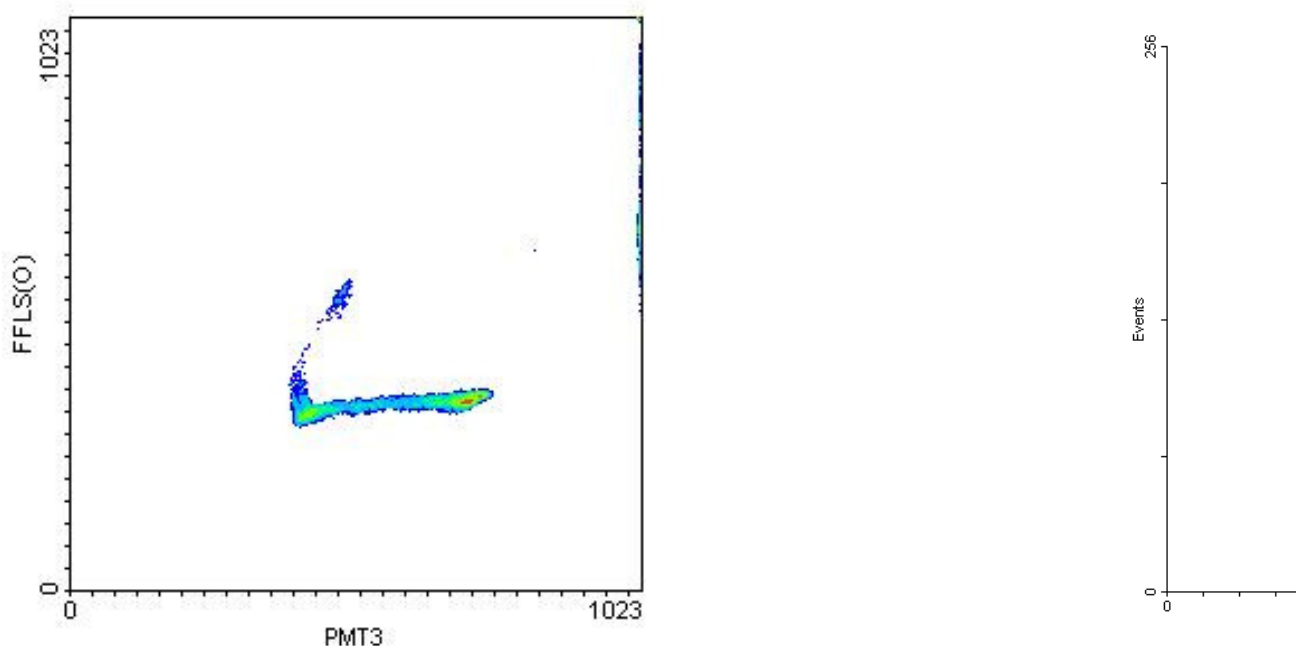


Figura 3.- Dot-plot (izquierda) e histograma (derecha) donde pueden observarse las poblaciones X y Y de espermatozoides de cerdo. En la izquierda, el centro de las poblaciones quedan

representados por los puntos rojos mientras que en el de la izquierda quedan representados por los vértices en el histograma. El vértice de la izquierda corresponde a la población de espermatozoides Y mientras que el vértice de la derecha corresponde a la población de espermatozoides X.

El desarrollo de esta tecnología y el hecho de que el Hoechst 33342 fuera capaz de atravesar fácilmente la membrana de los espermatozoides vivos produciendo una fluorescencia proporcional al contenido de ADN, sin afectar a la motilidad de los mismos (Johnson, 1991), supuso un hecho de vital importancia ya que permitió la obtención de camadas a partir de espermatozoides separados viables, tanto portadores del cromosoma X, como portadores del cromosoma Y.

Aunque todos los citómetros adaptados a la separación espermática incorporaron, a partir de este momento, dispositivos similares a este, los rendimientos obtenidos seguían siendo insuficientes para la aplicación de forma generalizada de los espermatozoides separados, debido al gran número requerido para inseminación artificial, sobre todo en el ganado porcino (3000 millones de espermatozoides por dosis). Con el objetivo de aumentar el ritmo de producción de espermatozoides separados Johnson y cols. (1999) incorporaron el nuevo dispositivo de orientación diseñado por Rens y cols. (1998) a un citómetro de alta velocidad, capaz de trabajar a presiones elevadas aumentando hasta diez veces la velocidad de separación permitida por los separadores estándar. El elevado porcentaje de espermatozoides orientados en combinación con mejoras en los dispositivos electrónicos de los equipos permitieron aumentar la producción de espermatozoides separados, hasta alcanzar los 15 millones por hora descritos por Johnson y Welch (1999), manteniéndose las purezas en niveles superiores al 85 %. La incorporación de nuevas herramientas como es la hibridación in situ fluorescente para la detección de la pureza de la

separación ayuda a conocer la eficiencia del procedimiento (Parrilla y cols., 2003) (Figura 4).

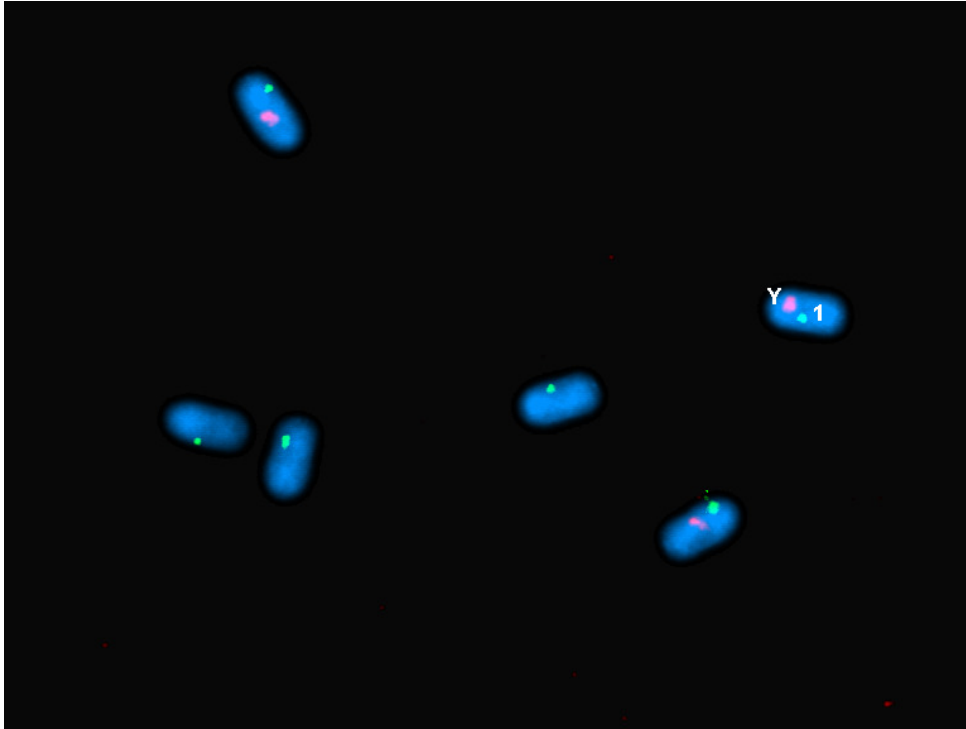


Figura 4.-Hibridación in situ fluorescente de espermatozoides de verraco procedente de un eyaculado. En azul se observan las cabezas de los espermatozoides. El punto fluorescente verde corresponde a la presencia de un cromosoma 1 (utilizado como control de hibridación) mientras que en rosa aparece la presencia de un cromosoma Y.

6.- Obtención de descendencia tras la utilización de espermatozoides separados

La citometría de flujo ha demostrado ser una técnica eficaz para la obtención de descendencia del sexo deseado en el ganado porcino (Tabla 1). Sin embargo, una reducción en las tasas de gestación así

como en los tamaños de camadas ha sido descrita en diferentes especies como resultado de la utilización de espermatozoides separados en las inseminaciones (Johnson y cols., 1989; Johnson, 1991; Cran y cols., 1993; Seidel y cols., 1999; Vazquez et al., 2003; Maxwell y cols., 2004).

Tabla 1.- Primer nacimiento producido después de la inseminación con espermatozoides separados mediante citometría de flujo.

Método de Inseminación	Tipo de espermatozoide separado	Dosis inseminada	Referencia
Quirúrgica	Recien separados	0'3 x 10^6	Johnson (1991)
Fecundación in vitro	Recien separados	-	Rath y cols (1997)
Quirúrgica	Congelados	0'4 x 10^6	Johnson (2000)
Inseminación Intrauterina Profunda	Conservados en medio líquido 10h	70 x 10^6	Vazquez y cols (2003)
Inyección intracitoplásmica	Recien separados	-	Probst y cols (2003)

Sin embargo la causa principal de esta reducción en la fertilidad de los espermatozoides separados todavía debe ser determinada. Aunque no existen daños aparentes en el ADN espermático (Parrilla y cols., 2004), un aumento en la pérdida de embriones en estadios tempranos de la gestación, y otros factores relacionados con la dosis de inseminación, momento de realización de la misma en relación con el momento de la ovulación (Vazquez et al., 2003), o la reducida viabilidad de los espermatozoides separados en el tracto genital femenino (Parrilla et al., 2005) son algunos de los factores a estudiar para conseguir unos niveles de viabilidad y fertilidad post-separación adecuados (Maxwell y cols., 2004) más aun desde que se han obtenido conocimientos acerca del estado de los espermatozoides en el oviducto (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Actualmente se están realizando algunos estudios cuya finalidad es incrementar la supervivencia de estos espermatozoides mediante la adición de plasma seminal o proteínas seleccionadas del mismo (Centurión et al., 2003; Caballero et al., 2004).

6.1. Producción in vitro de embriones.

Debido al bajo número de espermatozoides que el citómetro es capaz de separar por unidad de tiempo, una de las posibles vías en la aplicación de los espermatozoides separados es la producción in vitro de embriones, bien a través de técnicas convencionales de fecundación in vitro, bien a través de técnicas de inyección intracitoplasmática y la posterior transferencia de embriones. El principal inconveniente de esta técnica es el bajo rendimiento que produce en el caso del porcino debido al elevado índice de polispermia (Gil et al., 2004)

Los primeros resultados se obtuvieron en 1993 (Cran y cols.) con espermatozoides de toro, los cuales, tras la separación, fueron utilizados en la producción in vitro de embriones con una buena tasa de nacimientos tras la transferencia. En el caso del porcino, en 1997 (Rath y cols.) y 1998 (Abeydeera y cols.) se obtuvieron los primeros nacimientos tras la fecundación in vitro y posterior transferencia quirúrgica en cerdos.

Recientemente, se han obtenido nacimientos tras la producción de embriones a partir de espermatozoides sexados mediante inyección intracitoplasmática en el ovocito (ICSI) (Probst y Rath, 2003). En esta misma línea, acaban de ser publicados los primeros resultados en la producción de embriones in vitro a partir de espermatozoides separados y congelados (Batagate y cols. 2005)

6.2. Inseminaciones quirúrgicas y no quirúrgicas.

No cabe duda que el método ideal de utilización de los espermatozoides separados sería una metodología que empleara la inseminación artificial al tiempo que necesitara un bajo número de espermatozoides para conseguir un buen porcentaje de gestaciones.

En el ganado vacuno esta es una técnica de la que se tiene importante información en cuanto a que son más de 2000 vacas las inseminadas con semen separado. Los resultados obtenidos con espermatozoides sexados y, posteriormente congelados muestran que se puede obtener un 50% de gestaciones con una pureza esperada del 85% cuando se inseminan entre 1 millón y 1 millón y medio de espermatozoides (Seidel et al., 1999).

En el ganado porcino la situación actual es diferente. Los primeros resultados de gestación se obtuvieron realizando inseminaciones quirúrgicas en oviducto (Johnson, 1991). Aunque este sistema de inseminación es un procedimiento complejo, la simplificación de las inseminaciones utilizando técnicas laparoscópicas abren un nuevo campo de investigación en la obtención de lechones de sexo deseado.

Debido a que las inseminaciones convencionales se realizan con 3 mil millones de espermatozoides, conseguir esta dosis mediante citometría de flujo requeriría 15 días de trabajo ininterrumpido. Este factor limitante hacía impensable la utilización de espermatozoides mediante una vía que no fuera la quirúrgica. Tras el desarrollo de una sonda de

inseminación intrauterina profunda (Martinez et al., 2002, Vazquez et al., 2005) que permitía alcanzar las proximidades de la unión uterotubárica y depositar aquí los espermatozoides, se empezaron a realizar las primeras inseminaciones con espermatozoides separados mediante citometría de flujo, alcanzándose la primera gestación por vía no quirúrgica utilizando 70 millones de espermatozoides (Vázquez et al., 2003) utilizando protocolos anteriormente establecidos en cerdas con ovulación inducida u ovulación espontánea. Posteriormente y utilizando la misma metodología, se ha descrito el nacimiento de lechones hembras en Alemania (Rath et al., 2003).

7.- Criopreservación de espermatozoides separados de porcino

La criopreservación de espermatozoides separados de verraco representaría un importante avance desde el punto de vista comercial ya que la utilización de espermatozoides congelados ha supuesto un paso importante en la aplicación de esta técnica.

Desde 1975 existe semen criopreservado de porcino disponible en el mercado y aunque ha sido utilizado para la producción comercial y para la obtención de animales de alto valor genético, su uso no alcanza los niveles de eficiencia obtenidos con el semen fresco o conservado en estado líquido. Esta disminución en la eficiencia puede ser debida a los daños que sufre el espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación (Roca y cols., 2003), los cuales se verán aumentados cuando el proceso de criopreservación se realice sobre espermatozoides previamente separados por citometría de flujo (Parrilla et al., 2005).

Espermatozoides de cerdo han sido criopreservados con éxito tras su separación y posteriormente descongelados y aplicados mediante inseminación quirúrgica (Johnson, 2000). Los análisis de viabilidad, basados en una estimación de la motilidad, demostraron que aproximadamente un 30 % de los espermatozoides son capaces de

soportar procesos de separación y congelación consecutivos. Como resultado de estas experiencias se produjo el nacimiento de cuatro camadas con un tamaño medio de 6.8 lechones por camada. Estos resultados tienen una especial importancia ya que demuestran que es posible el almacenamiento de los espermatozoides separados durante periodos largos de tiempo, manteniendo su capacidad fecundante. Además, los nuevos avances en la criopreservación espermática permiten pensar en la posibilidad de la congelación de los espermatozoides separados (Jonson et al., 2005). Recientemente, espermatozoides de cerdo separados y congelados han sido utilizados con éxito en la producción in vitro de embriones (Bathgate et al., 2005)

Bibliografía

Abeydera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Bosquet AC, Cantley TC, Rieke A y Day BN (1998). 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* 50:981-988.

Bathgate R, Mortin KM, Eriksson BM, Rath D, Seig B, Chami O, Stojanov T, Maxwell WMC y Evans G (2005). Production of porcine embryos of a predetermined sex after in vitro fertilization of in vitro-matured oocytes with sex-sorted frozen-thawed boar sperm. *Reproduction, Fertility and Development* 17:303

Caballero I, Vazquez JM, Gil MA, Calvete JJ, Roca J. Sanz L, Parrilla I, Garcia E, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA (2004) Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to fertilize homologous oocytes in vitro?. *Journal of Andrology* 25:1004-1012.

Centurión F, Vázquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, García EM, Martínez EA (2003). Influence of Porcine Spermadhesins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High dilution. *Biology of Reproduction* 69:640-646.

Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D y Polge C (1993). Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm and in vitro fertilisation. *Vet. Rec.* 132:40-41

Garner DL (2001). Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *Journal of Andrology* 22: 519-526.

Gil MA,; Ruiz M, Vázquez JM, Roca J, Day BN, Martínez EA (2004).. Effect of short periods of sperm–oocyte coincubation during in vitro fertilization on embryo development in pigs, *Theriogenology* 62:544-552.

Johnson LA (1991). Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination and flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod. Dom. Anim.* 26:309-314.

Johnson LA (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 93-107.

Johnson LA, Flook JP y Hawk HW (1989). Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41:199-203.

Johnson LA, Flook JP y Hawk HW (1989). Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41:199-203.

Johnson LA, Welch G y Rens W (1999) The Beltsville sperm sexing technology: High-Speed sperm sorting gives improved sperm output for

in vitro fertilization y AI. J. Anim. Sci. Vol:77, Suppl. 2/J. Dairy Sci. Vol:82, Suppl. 2/1999.

Johnson LA, Rath D, Vazquez JM, Maxwell WMC and Dobrinsky JR (2005). Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology* 63: 615-624.

Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Vázquez JL (2002) Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reproduction* (Supplement 58): 301-311.

Maxwell WM, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, De Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK (2004). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:79-95.

Parrilla I, Vázquez JM, Oliver-Bonet M, Navarro J, Yelamos J, Roca J, Martínez EA (2003) Fluorescence In Situ Hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by Nick Translation. *Reproduction* 126:317-325.

Parrilla I, Vázquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D, Martínez E (2004). Evaluation of genotoxic effect induced by Hoechst 33342 staining and ultraviolet laser exposure on flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 128: 615-621.

Parrilla I, Vázquez JM, Gil MA, Caballero I, Almiñana C, Roca J, Martínez E (2005). Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.11.004.

Pinkel D, Gledhill BL, Van Dilla M.A., Stephenson D. y Watchmaker G. (1982) High resolution DNA measurements of mammalian spermatozoa. *Cytometry*, 3: 1-9.

Probst S, Rath D. (2003) Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flow cytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology* 59:961-973.

Rath D, Johnson LA, Dobrinsky GR, Welch GR y Niemann H. (1997) Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X y Y chromosome- bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology*, 47: 795-800.

Rath D, Ruiz S, Sieg B (2003). Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Veterinary Record* 152: 400-401.

Rens W, Welch G y Johnson LA (1998). A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X y Y chromosome-bearing sperm. *Cytometry* 33: 476-481.

Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JM, Martínez EA (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 60: 77-87.

Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of Andrology* 26:15-24. 2005.

Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren W, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Sanz L, Calvete JJ (2005) Boar spermatozoa in oviduct. *Theriogenology* 63:514-535

Seidel G (2003). Sexing mammalian sperm. Intertwining of commerce, technology, and biology. *Anim. Reprod. Sci.* 79:145-156.

Seidel GE y Johnson LA (1999) Sexing mammalian sperm – Overview. Theriogenology. 52: 1267-1272.

Seidel GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD y Cran DG (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. Theriogenology 52:1407-1420

Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Lucas X, Parrilla I. (2001). Sex-sorting boar sperm: problems and possibilities. Archiv. Für Tierzucht. 44: 141-145.

Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vázquez JL (2003). Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted spermatozoa. Theriogenology 59: 1605-1614. 2003.

Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Vázquez JL (2005) Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. Theriogenology 63:536-547.