



Espermatozoides sexados de porcino. Actualización de los métodos de producción asociados

● D Rath¹, D Tiedemann¹, L Gamrad^{2,3}, LA Johnson⁴, S Klein¹, W Kues¹, R Mancini¹, C Rehbock^{2,3}, U Taylor¹, S Barcikowski^{2,3}

¹Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee, Germany; ²Institute for Technical Chemistry I UDE, Essen, Germany; ³CENIDE, Essen, Germany; ⁴Mt Airy, MD, USA.

CONTENIDOS

El sexaje de espermatozoides en la especie porcina, al igual que en otros mamíferos, está basado en la técnica cuantitativa de citometría de flujo. La mayor desventaja de esta técnica es la relativa baja eficiencia para producir suficientes espermatozoides sexados para la inseminación artificial (IA), lo cual ha promovido la búsqueda de enfoques diferentes en el proceso de sexaje y selección. Por ejemplo, el incipiente campo de la nanotecnología bien pudiera contribuir a este cambio de paradigma, ya que disponemos de bio-nanosondas altamente eficientes. Independientemente del método usado, a estas alturas pequeños desarrollos requieren de enormes inversiones y de la puesta en marcha de una complicada logística para llevar la nanotecnología al ámbito práctico del mercado porcino. Sólo empresas globales serán capaces de impulsar los proyectos de investigación necesarios, que llevarán a los productores de porcino a poder seleccionar el sexo de sus producciones, como sucede en la industria de vacuno hoy en día.

INTRODUCCIÓN

Hace ya veintiséis años que Johnson *et al.* (1989) reportó la primera camada nacida viva producida a partir de espermatozoides sexados. Dos años después se obtuvieron lechones a partir de inseminaciones oviductales con espermatozoides sexados mediante citometría de flujo (Johnson, 1991). A partir de ahí, la llamada Tecnología de Sexaje Espermático Beltsville ha alcanzado la fase de comercialización promovida por la empresa XY Inc. y su sucesora en la licencia, Sexing Technologies (Navasota, Texas). Sin embargo, debido a la gran cantidad de espermatozoides requeridos para lograr una fertilización exitosa (tanto en dosis frescas como en semen congelado), la técnica no ha resultado ser práctica para el mercado. Los productores de carne, en general, se beneficiarían del uso de espermatozoides sexados produciendo más lechones hembras. A parte del beneficio económico que esto implicaría, conseguiríamos abolir la castración de machos; particularmente en Europa, donde el bienestar animal es siempre un tema de discusión candente. Recientemente hemos revisado

el estado de la técnica de sexaje en general (Rath & Johnson 2008; Rath *et al.*, 2009, 2013). Aquí, revisaremos las estrategias para incrementar la proporción de hembras en los partos, indicando los avances técnicos hasta hoy, y sus limitaciones.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo fue desarrollada originalmente en la década de 1960 desde la investigación humana médica y diagnóstica, y actualmente es usada por una amplia gama de disciplinas para analizar y/o separar poblaciones celulares. Su uso en reproducción animal para el sexaje de espermatozoides con cromosoma X ó Y comenzó en la década de 1980 en USDA Beltsville, Maryland, a través de modificaciones del instrumento (Johnson & Pinkel, 1986) y el desarrollo de protocolos que incluían tinciones de fluorescencia Hoechst 33342 (Johnson *et al.*, 1987a,b, 1989). La modificación clave que hizo posible la separación de espermatozoides en base a su contenido de ADN fue la adición de un segundo detector de fluorescencia el cual, en combinación con la *aguja de inyección de muestra biselada*, permitía la medición del contenido de ADN desde dos ángulos. Estas modificaciones en combinación con el uso del colorante vital Hoechst 33342, que tiñe a los espermatozoides manteniendo su viabilidad y capacidad fecundante, fueron la base del éxito del sexaje espermático en mamíferos mediante citometría de flujo. Posteriormente, se han descrito detalladamente modificaciones, protocolos y mejoras técnicas del método de sexaje en varios artículos y revisiones (Johnson, 1997; Rens *et al.*, 1998; Johnson & Welch, 1999; Rath *et al.*, 2009).

A pesar de las muchas mejoras técnicas patentadas recientemente, el principio de sexaje no ha cambiado desde los primeros trabajos de Johnson (1991). Sin embargo, un paso importante para la implementación del sistema de sexaje fue la introducción de citómetros de flujo de alta velocidad, que permitían la producción de una razonable cantidad de espermatozoides sexados (Johnson & Welch, 1999). Todos los espermatozoides sexados producidos en la actualidad independientemente de la especie, lo son usando estos instrumentos y protocolos de citometría de alta velocidad.

LIMITACIONES DEL PROCESAMIENTO DE SEMEN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Hay dos limitaciones principales en la producción de espermatozoides sexados, que son la eficiencia de la separación (producción por hora) y el almacenamiento del espermatozoide tras su separación antes de la IA. A diferencia de otros enfoques, cuyo objetivo es la separación de subpoblaciones espermáticas en base a características físicas, como la carga eléctrica, la velocidad o su patrón de superficie (sirva de ejemplos las patentes recientes EP2486406 y EP0089448), la citometría de flujo reconoce e identifica cada espermatozoides individualmente, y correlaciona una carga eléctrica específica o una desviación del pulso láser con información de fluorescencia ligada al sexo. Además, las diferencias cuantitativas en la emisión de fluorescencia se han usado para crear una señal distintiva entre las poblaciones, pero esto requiere una determinada orientación de las cabezas espermáticas frente al láser. Incluso si el proceso de citometría de flujo usado hoy en día aún fuera mejorado 10 veces, ofreciendo unos 200 millones de espermatozoides sexados por hora, llevaría 8-10 h producir una sola dosis convencional de IA de espermatozoides sexados. Otros obstáculos de la técnica son la sensibilidad de los espermatozoides sexados a la alta dilución, a la criopreservación y a modificaciones de membrana capacitantes que suceden durante el proceso (Maxwell & Johnson, 1997; Maxwell et al., 1998). Recientemente, hemos encontrado que el paso del espermatozoide a través de un campo electrostático afecta a las mitocondrias espermáticas. La microscopía electrónica de transmisión muestra claros daños en las crestas mitocondriales causados presumiblemente por despolarizaciones de membrana y por especies oxígeno-reactivas, lo cual disminuye la vida del espermatozoide (Klinc

& Rath, 2007; Rath et al., 2013). Hay nuevos antioxidantes que podrían contribuir a mejorar las características de motilidad tras el sexaje, prolongando la vida útil del espermatozoide hasta un valor más normal (Xia et al., 2012). Además, se han encontrado factores específicos en el espermatozoide de porcino perjudiciales para el sexaje. Alkmin et al. (2014c) encontró que los eyaculados de aproximadamente el 15% de los verracos no son adecuados para el sexaje. Aquellos verracos cuyos eyaculados si podían ser sexados mantuvieron esta capacidad durante los 5 meses que duró el estudio. Mas aún, si se reducía la presencia de plasma seminal al 0%, o 10%, un período de incubación de 24 h antes de su sexaje no afectaba a este proceso ni al almacenamiento posterior, mientras que la presencia del 50% de plasma seminal reducía la eficiencia del sexaje, pero no el almacenamiento posterior líquido (Alkmin et al., 2014a,b). Una alternativa para incrementar la velocidad del sexaje sería el desarrollo de microfluídica, técnica emergente que no sólo emplea conocimiento de citometría de flujo, sino además provee de un escenario nuevo para aplicaciones hidrodinámicas. Independientemente de si el principio de diferenciación cuantitativa del ADN será el elegido, o si habrá otros métodos más eficientes, el impacto del uso paralelo de chips y microfluidos será de gran impacto en cualquier caso, como se apunta en varias patentes recién publicadas (US20140273192, US20140273179, US20110008767, US20140273059).

SEÑALES CUALITATIVAS

En contraste con el sexaje cuantitativo, sería mucho más eficiente identificar características espermáticas relacionadas con el sexo, que podrían ser usadas para identificar una población espermática. Dado que el único factor conocido para distinguir los espermatozoides es la secuencia diferenciada (→

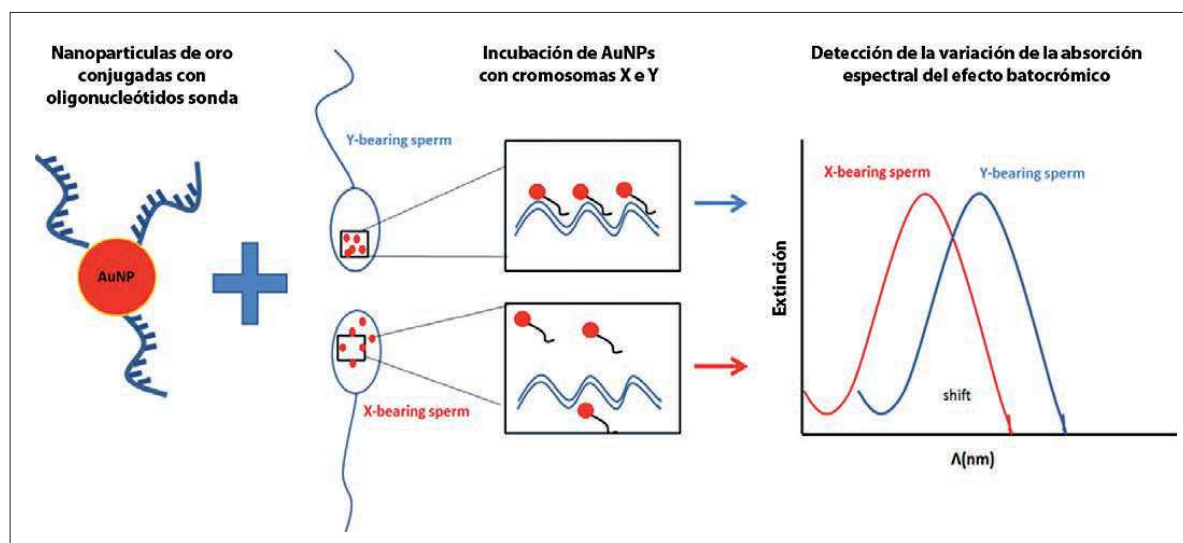


Tabla 7: Clasificación de espermatozoides basados en nanopartículas. Detección óptica principal basada en el desplazamiento del pico de resonancia plasmónica sobre acumulación regional de AuNPs. (A) Diseño de un nano-bioconjugado con una formación de hibridación triplex de oligo. (B) Distribución de AuNPs conjugado en cromosomas X e Y del espermatozoide. Formación selectiva triplex en el cromosoma Y genera la agregación de nanopartículas. (C) Detección de los resultados de agregación en un cambio batocrómico (cambio de absorción espectral) (por cortesía de Mancini R, 2015).



de ADN de los heterosomas, una opción es buscar técnicas que identifiquen secuencias específicas heterosómicas. Un método no destructivo específico para el marcaje de secuencias del cromosoma Y es la llamada *unión Hoogsteen*. Esta estructura de ADN de triple hélice es posible con secuencias de poli-purina y poli-pirimidina. El lugar de unión a la doble hélice sucede en su giro mayor (*Ghosh & Bansal, 2003*). Hemos identificado y desarrollado una sonda de oligonucleótidos que reconoce e hibridiza ciertas secuencias del cromosoma Y, formando una triple hélice *Hoogsteen*. Esta sonda puede conjugarse con nanopartículas de oro, que son bioquímicamente inertes y no afectan a los gametos ni a la fertilización (*Rehbock et al., 2014; Taylor et al., 2014a; Tiedemann et al., 2014*). Estos oligonucleótidos conjugados producen una señal estable de alto rendimiento cuántico cuando se agregan selectivamente en la proximidad del cromosoma Y. Especialmente cuando se producen mediante ablación láser en líquidos, las nanopartículas de oro pueden ser funcionalizadas fácilmente, y ser combinadas con sustancias catiónicas tales como oligonucleótidos y péptidos (*Barchanski et al., 2011; Barcikowski & Compagnini, 2013; Gamrad et al., 2014b; Rehbock et al., 2014*). Mientras que la unión *triplex* y su marcación han sido establecidas bajo condiciones de laboratorio, la internalización de nanopartículas a través de membranas espermáticas intactas aún presenta dificultades (*Taylor et al., 2014*). La investigación actual está enfocada a encontrar mecanismos de transporte a través de la membrana con el objetivo de marcar el cromosoma Y, lo cual acelerará el proceso de separación.

Seguramente el sexado así concebido no será capaz de satisfacer las demandas de la industria porcina. Sin embargo, en combinación con otras biotecnologías, es razonable pronosticar una comercialización exitosa de esta tecnología en un futuro cercano. En primer lugar, las estrategias de IA deberán adaptarse. La dosis de IA tradicional en fresco varía entre 1,5 y 3 mil millones de espermatozoides, y alrededor de 5 mil millones de espermatozoides congelados/descongelados. Dependiendo del lugar de deposición de los espermatozoides, las dosis en porcino son mucho más variables que las dosis, por ejemplo, de rumiantes. La principal razón radica en el hecho de que de forma natural, por ejemplo en rumiantes, el esperma de bovino es depositado por el toro frente al cérvix, que ejerce de filtro contra el esperma infértil. La IA tras el cérvix o dentro del cuerpo uterino traspasa los filtros cervicales y el esperma migra sin mayores pérdidas hacia la unión utero-tubárica y hacia el oviducto, donde sucede un segundo filtrado (*Mullins & Saacke, 1989*). En contraste, durante la cópula el semen de porcino es depositado por el verraco en la parte craneal del cérvix y en el cuerpo uterino. La selección espermática sucede principalmente en el cuerno uterino, y tras la IA, una gran cantidad de espermatozoides y volumen es rechazado por reflujo retrógrado a través de la vagina (*Viring & Einarsson, 1981; Steverink et al., 1998; Matthijs et al., 2000, 2003*). Debido a esto, es posible disminuir significativamente el número de espermatozoides por dosis de IA usando inseminación intrauterina profunda

y depositándolos cerca de la unión uterotubárica (*Martínez et al., 2001a,b, 2002, 2006; Vázquez et al., 2003, 2005, 2008a,b; Grossfeld et al., 2005*). Bajo condiciones experimentales, se vio que incluso un muy bajo número de espermatozoides (1×10^6) fueron suficientes para originar camadas (*Krueger et al., 1999; Krueger & Rath, 2000*).

También es posible reducir significativamente el número de espermas inseminados si son insertados directamente en el oviducto, bien por laparotomía usando sólo 2×10^5 espermatozoides sexados o no sexados por oviducto (*Vázquez et al., 2008a; Roca et al., 2011; del Olmo et al., 2014*). Para propósitos de investigación y quizá para la producción en granjas núcleo, esta técnica podría ser comercialmente aplicable. No es, sin embargo, una tecnología útil que pueda desplazar la castración, o que aspire a ser eficiente para producir camadas de hembras.

La investigación actual busca evitar el uso de inseminación quirúrgica. Una posibilidad es la reducción de pérdida de espermatozoides durante la migración uterina, interrumpiendo su unión a la pared uterina. Los espermatozoides intactos parecen unirse transitoriamente a la pared uterina, mientras que la mayoría del flujo retrógrado está compuesto por espermas menos viables. La unión de los espermatozoides cambia la expresión genética del patrón inflamatorio y anti-inflamatorio uterino indicando una interacción muy específica, lo que puede regular un reservorio transitorio espermático, que podría ser importante para las cerdas de ovulación tardía, o podría ser una señal temprana que prepare al útero para la posterior implantación de los embriones (*Taylor et al., 2008, 2009a,b,c; Junge et al., 2010, 2011*). Sin embargo, dado que las gestaciones no se ven afectadas cuando el semen es depositado a nivel de la unión uterotubárica, una prevención bioquímica de esta interacción presumiblemente tampoco afectará a la gestación.

FERTILIZACIÓN IN VITRO Y TÉCNICAS RELACIONADAS PARA PRODUCIR CAMADAS DE SEMEN SEXADO

Sólo son necesarios unos pocos espermatozoides para realizar fertilización *in vitro* (IVF) con oocitos madurados *in vivo* o *in vitro*. Los primeros embriones de IVF con espermatozoides sexados de verracos fueron producidos hace 23 años. En estos experimentos tempranos se recolectaron complejos oocito-cúmulus de cerdas prepuberales superovuladas, poco después de su ovulación. Noventa y dos embriones producidos de células espermáticas sexadas X fueron transferidos quirúrgicamente a dos recipientes. Las hembras parieron 10 hembras saludables (*Rath et al., 1993*). En posteriores experimentos usando espermatozoides sexados (mediante alta velocidad) en dosis frescas, se obtuvieron camadas de IVF usando oocitos madurados *in vivo* e *in vitro* (*Rath et al., 1997, 1999; Aberydeera et al., 1998*). Otro enfoque puede ser la transferencia de gametos intra-falopio (GIFT) en la que oocitos maduros y esperma sexado se depositan juntos en una pajueta de plástico, y son transferidos en los oviductos



de cerdas periovulatorias. Comparando el GIFT con esperma no sexado y sexado, 50% y 48% de óvulos recuperados habían evolucionado a blastocistos con 25-80 células (Rath *et al.*, 1994). Existe otra técnica que requiere incluso de menos espermatozoides. La inyección espermática intracitoplasmática ha venido usándose para producir camadas de machos usando un solo espermatozoide sexado por ovocito (Probst & Rath, 2003). Sin embargo, excepto para el GIFT, todas estas técnicas *in vitro* sólo serían aceptables para la industria si permitieran una transferencia embrionaria no quirúrgica. El prerrequisito es un sistema eficiente para producir embriones hasta fase mórula o blastocisto *in vitro*. Los instrumentos de transferencia y las técnicas adecuadas han sido desarrolladas por Roca *et al.* (2003, 2006, 2011) y Krisher & Wheeler (2010), los cuales han desarrollado un sistema casi automático para la producción *in vitro* con chips en microfluidos. Por lo tanto, es muy probable que en un periodo aceptable de tiempo, se encuentre disponible en el mercado un sistema de produc-

ción avanzada de embriones combinado con un sistema de transferencia no quirúrgica, usando semen sexado.

EVITANDO LA CASTRACIÓN MEDIANTE MEDIDAS ALTERNATIVAS

Como se ha mencionado previamente, la nanotecnología tendrá un impacto significativo en las estrategias de cría animal. Las nanopartículas ya son frecuentemente usadas para cometidos médicos, vehiculando fármacos directamente al punto de acción, o ayudando a destruir tejido tumoral. Encontramos cada vez más publicaciones enfocadas en nanopartículas con funcionalidad dirigida, magnetizables, o nanopartículas magnéticas que producen calor local que destruye algún tejido específico (Babincova & Babinec, 2009). Balivada *et al.* (2010) describieron un método para calentar tumores cerebrales mediante un campo eléctrico AC de alta energía, que provocaba que pequeñas nanopartículas magnetizadas vibraran y produjeran calor. Modificaciones de este sistema, empleadas en testículos de lechones macho jóvenes que pasen por un simple aparato AC en el establo, podrían elevar la temperatura de nanopartículas magnetizadas y destruir el tejido germinal o, al menos, afectar a la espermatogénesis de forma no reversible para que el tejido no sea capaz de producir espermatozoides vivos.

En conclusión, hay muchas aproximaciones interesantes que intentan acercar el esperma sexado de porcino a su aplicación comercial desde los primeros experimentos en Beltsville. En este contexto, el campo creciente de la nanotecnología contribuirá significativamente a estos desarrollos, proporcionando nano-sondas eficientes, por ejemplo. A partir de aquí, el desarrollo requiere enormes inversiones y la puesta en marcha de logísticas complicadas, para introducir la tecnología en el mercado del porcino. Sólo empresas globales internacionales podrán afrontar y desarrollar los proyectos necesarios para ello, pero al final dispondremos de una selección de sexo en la industria porcina, al igual que ocurre hoy en día en la industria de vacuno. 🐷

Referencias bibliográficas

- Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Boquest AC, Cantley TC, Rieke A, 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, 981–8.
- Alkmin DV, Parrilla I, Tarantini T, del Olmo D, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, 2014a: Influence of high dilution and sorting on the capability of sex-sorted boar sperm to sustain a long-time liquid storage. *Reprod Domest Anim* 49, 119.
- Alkmin DV, Parrilla I, Tarantini T, Del Olmo D, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, 2014b: Seminal plasma affects sperm sex sorting in boars. *Reprod Fertil Dev.* 2014 Aug 28 doi: 10.1071/RD14088.
- Alkmin DV, Parrilla I, Tarantini T, Parlapan L, Del Olmo D, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, 2014c: Intra- and inter boar variability in flow cytometric sperm sex sorting. *Theriogenology* 82, 501–8.
- Babincova M, Babinec P, 2009: Magnetic drug delivery and targeting: principles and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 153, 243–50.
- Balivada S, Rachakatla RS, Wang H, Samarakoon TN, Dani RK, Pyle M, Kroh FO, Walker B, Leaym X, Koper OB, Tamura M, Chikan V, Bossmann SH, Troyer DL, 2010: A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. *BMC Cancer* 10, 119.
- Barchanski A, Taylor U, Klein S, Petersen S, Rath D, Barcikowski S, 2011: Golden perspective: application of laser-generated gold nanoparticle conjugates in reproductive biology. *Reprod Domest Anim*, 46 (Suppl 3), 42–52.
- Barcikowski S, Compagnini G, 2013: Advanced nanoparticle generation and excitation by lasers in liquids. *Phys Chem Chem Phys* 15, 3022–6.
- Bucci D, Galeati G, Giaretta E, Tamanini C, Spinaci M, 2013: Sex-sorting of boar spermatozoa does not influence the localization of glucose transporters. *Reprod Biol* 13, 341–3.
- Gamrad L, Rehbock C, Krawinkel J, Tumursukh B, Heisterkamp A, Barcikowski S, 2014: Charge balancing of model gold-nanoparticle-peptide conjugates controlled by the peptide's net charge and the ligand to nanoparticle ratio. *J Phys Chem C* 118, 10302–13.
- Ghosh A, Bansal M, 2003: A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 620–6.



Referencias bibliográficas

- Grossfeld R, Klinc P, Sieg B, Rath D, 2005: Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology* 63, 2269–77.
- Johnson LA, 1991: Sex preselection in swine - altered sex-ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X-bearing and Y-bearing sperm. *Reprod Domest Anim* 26, 309–14.
- Johnson LA, 1997: Advances in gender preselection in swine. *J Reprod Fertil Suppl* 52, 255–66.
- Johnson LA, Pinkel D, 1986: Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 7, 268–73.
- Johnson LA, Welch GR, 1999: Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52, 1323–41.
- Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D, 1987b: Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res* 16, 1–9.
- Johnson LA, Flook JP, 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.
- Junge S, Taylor U, Schuberth HJ, Baulain U, Rath D, 2010: Influence of inseminate components on the presence of leukocytes and spermatozoa in the porcine uterus 2 hours after artificial insemination (AI). *Reprod Domest Anim* 45, 66–66.
- Junge S, Taylor U, Schuberth HJ, Guenther J, Baulain U, Rath D, 2011: Seminal plasma and spermatozoa modulate gene expression in the porcine uterus. *Reprod Domest Anim* 46, 105–105.
- Klinc P, Rath D, 2007: Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod Domest Anim* 42, 63–7.
- Krisher RL, Wheeler MB, 2010: Towards the use of microfluidics for individual embryo culture. *Reprod Fertil Dev* 22, 32–9.
- Krueger C, Rath D, 2000: Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod Fertil Dev* 12, 113–17.
- Krueger C, Rath D, Johnson LA, 1999: Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology* 52, 1363–73.
- Mancini R, 2015: Detection of Y-chromosome bearing bovine sperm using laser-generated gold nanoparticle bioconjugates. Doctoral Thesis, Vet. Univ. Hannover, 2015.
- Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN, 2001a: Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction* 122, 289–96.
- Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Vazquez JL, 2001b: Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reprod Suppl* 58, 301–11.
- Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN, 2002: Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non sedated sows. *Reproduction* 123, 163–70.
- Martinez EA, Vazquez JM, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Vazquez JL, 2006: Incidence of unilateral fertilizations after low dose deep intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. *Reprod Domest Anim* 41, 41–7.
- Matthijs A, Harkema W, Engel B, Woelders H, 2000: In vitro phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows. *J Reprod Fertil* 120, 265–73.
- Matthijs A, Engel B, Woelders H, 2003: Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. *Reproduction* 125, 357–67.
- Maxwell WM, Johnson LA, 1997: Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48, 209–19.
- Maxwell WM, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR, 1998: The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 10, 433–40.
- Mullins KJ, Saacke RG, 1989: Functional-anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat Rec* 225, 106–17.
- del Olmo D, Parrilla I, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Angel MA, Tarantini T, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, Roca J, Vazquez JM, Martinez EA, 2014: Successful laparoscopic insemination with a very low number of flow cytometrically sorted boar sperm in field conditions. *Theriogenology* 81, 315–20.
- 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, 2008: Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Domest Anim*, 43(Suppl 2), 338–46.
- Rath D, Johnson LA, Welch GR, 1993: In vitro culture of porcine embryos: development to blastocysts after in vitro fertilization (IVF) with flow cytometrically sorted and unsorted semen. *Theriogenology*, 39, 293–293.
- Rath D, Johnson LA, Welch GR, Niemann H, 1994: Successful gamete intrafallopian transfer (GIFT) in the porcine. *Theriogenology* 41, 1173–79.
- Rath D, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR, Niemann H, 1997: Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* 47, 795–800.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA, 1999: In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77, 3346–52.
- Rath D, Moench-Tegeder G, Taylor U, Johnson LA, 2009: Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71, 22–9.
- Rath D, Barcikowski S, de Graaf S, Garrels W, Grossfeld R, Klein S, Knabe W, Knorr C, Kues W, Meyer H, Michl J, Moench-Tegeder G, Rehbock C, Taylor U, Washausen S, 2013: Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction* 145, R15–R30.
- Rehbock C, Jakobi J, Gamrad L, van der Meer S, Tiedemann D, Taylor U, Kues W, Rath D, Barcikowski S, 2014: Current state of laser synthesis of metal and alloy nanoparticles as ligand-free reference materials for nano-toxicological assays. *Beilstein J Nanotechnol* 5, 1523–41.
- Rens W, Welch GR, Johnson LA, 1998: A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome-bearing sperm. *Cytometry* 33, 476–81.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA, 2003: Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 60, 77–87.
- Roca J, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA, 2011: Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Anim* 46, 79–83.
- Steverink DW, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B, 1998: Semen backflow after insemination and its effect on fertilisation results in sows. *Anim Reprod Sci* 54, 109–19.
- Taylor U, Rath D, Zerbe H, Schuberth HJ, 2008: Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reprod Domest Anim* 43, 166–75.
- Taylor U, Zerbe H, Seyfert HM, Rath D, Baulain U, Langner KFA, Schuberth HJ, 2009b: Porcine spermatozoa inhibit postbreeding cytokine induction in uterine epithelial cells in vivo. *Anim Reprod Sci* 115, 279–289.
- Taylor U, Zerbe H, Seyfert HM, Rath D, Schuberth HJ, 2009c: Binding of porcine spermatozoa to uterine epithelial cells modulates the female immune response and might indicate the formation of a preovulatory sperm reservoir. *Soc Reprod Fertil Suppl* 66, 83–84.
- Taylor U, Barchanski A, Petersen S, Kues WA, Baulain U, Gamrad L, Sajti I, Barcikowski S, Rath D, 2014b: Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration. *Nanotoxicology* 8, 118–27.
- Taylor U, Rehbock C, Streich C, Rath D, Barcikowski S, 2014a: Rational design of gold nanoparticle toxicology assays: a question of exposure scenario, dose and experimental setup. *Nanomedicine* 9, 1971–89.
- Tiedemann D, Taylor U, Rehbock C, Jakobi J, Klein S, Kues WA, Barcikowski S, Rath D, 2014: Reprotoxicity of gold, silver, and goldsilver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *Analyst* 139, 931–42.
- Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vazquez JL, 2003: Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 59, 1605–14.
- Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JL, 2005: Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* 63, 536–47.
- Vazquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Caballero I, Vazquez JL, Martinez EA, 2008a: Low-dose insemination in pigs: problems and possibilities. *Reprod Domest Anim*, 43(Suppl 2), 347–354.
- Vazquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vazquez JL, Martinez EA, 2008b: New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology* 70, 1216–24.
- Viring S, Einarsson S, 1981: Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts. *Nord Vet Med* 33, 145–9.
- Xia C, Xia W, Yang S, An L, Li X, Wu Z, Zhang J, Wang Z, Tian J, 2012: Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 136, 108–14.