

BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA EN PORCÍ: ESTAT ACTUAL I REPTES DE FUTUR

SERGI BONET, MARIA DOLORS BRIZ, ELISABETH PINART, SILVIA SANCHO,
EVA BUSSALLEU, MARC YESTE, ISABEL CASAS, ANNA FÁBREGAS, MARTA PUIGMULÉ,
ESTELA GARCÍA, MÓNICA SANTOS, EVA TORNER I SÍLVIA MICALÓ

TechnoSperm. Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona.

Adreça per a la correspondència: Sergi Bonet. TechnoSperm. Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, porta E, edifici Jaume Casademont. Pic de Peguera, 15. 17003 Girona. Adreça electrònica: sergi.bonet@udg.edu.

RESUM

La biotecnologia reproductiva en porcí inclou les diverses tècniques d'anàlisi de la qualitat seminal i les tècniques de reproducció assistida. Els objectius fonamentals són garantir la seguretat biològica, permetre'n la traçabilitat i incrementar (o estabilitzar) el rendiment reproductiu. Entre les tècniques d'anàlisi de la qualitat seminal destaquem les de determinació de qualitat espermàtica (concentració, motilitat, viabilitat, integritat de membranes i del DNA), les de control de l'estat sanitari (PCR-RT per a detecció de virus i bacteris) i les de determinació del poder fecundant i de la resistència osmòtica. Entre les tècniques de reproducció assistida es practiquen la inseminació artificial (cervical, postcervical i intrauterina), la fecundació *in vitro*, la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides, la vitrificació embrionària, la transferència embrionària no quirúrgica, la criopreservació espermàtica, el sexatge d'espermatozoides i d'embrions, el clonatge reproductiu i terapèutic i la transgènesi.

Paraules clau: reproducció assistida, semen, porcí, biotecnologia, *Sus domesticus*.

REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY IN PORCINE: THE CURRENT STATE AND CHALLENGES OF FUTURE

SUMMARY

Reproductive biotechnology in porcine includes several techniques of analysis of the seminal quality and techniques of assisted reproduction. The main goals are guaranteeing the biological security, allowing the traceability and increasing (or stabilizing) the repro-

ductive yield. Among the techniques of analysis of the seminal quality we highlight those of sperm quality (concentration, motility, viability, integrity of membranes and DNA), those of sanitary control (PCR-RT for the detection of virus and bacteria) and those of determination of fertilizing ability and osmotic resistance. Among the assisted reproduction techniques, there is artificial insemination (cervical, postcervical and intrauterine), *in vitro* fertilization, intracytoplasmic injection of spermatozoa, embryonic vitrification, non surgical embryonic transfer, sperm cryopreservation, spermatozoa and embryos sexing, reproductive and therapeutic cloning, and transgenity.

Key words: assisted reproduction, semen, porcine, biotechnology, *Sus domesticus*.

INTRODUCCIÓ

La recerca en biotecnologia de la reproducció porcina és objecte de l'activitat de nombrosos grups d'investigació estatals (Bonet *et al.*, 2006), entre els quals destaquen els dirigits per Juan Carlos Domínguez, de la Universitat de Lleó, el d'Ignacio Badiola, de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, el de Juan Enrique Rodríguez, de la Universitat Autònoma de Barcelona, el de Luis Jesús García i Fernando Juan Peña, de la Universitat d'Extremadura, el de Pedro García i Raúl Sánchez, de l'Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria, el d'Emilio Martínez i Pilar Coy, de la Universitat de Murcia, el de Carles Soler, de la Universitat de València, i el de Sergi Bonet, de la Universitat de Girona. Aquests onze grups de recerca, juntament amb vint-i-una empreses del sector, han constituït la Red Temática de Reproducción Porcina, una estructura de dinamització del sistema ciència-tecnologia-empresa que va comptar amb un ajut procedent del Ministeri d'Educació i Ciència a partir del Programa de Acciones Complementarias (AGL2002-12277-E). La biotecnologia de la reproducció porcina compta també amb nombrosos grups de recerca de referència internacional; entre d'altres destaquen els dirigits per P. F. Watson i W. V. Holt, del Royal Veterinary College de la Universitat de Londres (RU), i per L.

A. Johnson i V. G. Pursell, del Reproduction Laboratory of Beltsville (EUA).

La R + D + i del sector porcí s'orienta en quatre àmbits d'actuació: *a*) la seguretat reproductiva (l'increment i estabilització del rendiment reproductiu en termes de fertilitat i prolificitat), *b*) la seguretat genètica (creació de reserves de material genètic i de bancs de germoplasma, semen i embrions), *c*) la seguretat sanitària (millora del control sanitari de les dosis seminals refrigerades o criopreservades), i *d*) la seguretat alimentària (traçabilitat a partir de la determinació de marcadors moleculars de la qualitat de la carn) (Pruneda *et al.*, 2005; Bussalleu *et al.*, 2005).

El sector porcí s'organitza en nuclis de selecció (granges en les quals es milloren les races pures), centres de multiplicació (granges en les quals es duen a terme els encreuaments entre races pures), empreses de producció (granges en les quals té lloc la cria i engreix dels garrins) i escorxadors i sales d'especejament, que subministren a carnisseries i empreses de productes elaborats (assecadors de pernills, empreses d'embotits, empreses de cosmètica, etc.).

Comercialment, el sector porcí es deu a la llei de l'oferta i la demanada. El producte final que prefereix el consumidor varia en funció dels costums gastronòmics del país (preferències organolèptiques, tradicions culinàries, creences religioses, etc) i del

grau de desenvolupament econòmic del país. Legalment, el sector porcí es deu a les legislacions autonòmica, estatal i europea en els camps sanitari i del transport (importació i exportació intra i intercomunitària) d'animals vius, productes elaborats, gàmetes, embrions, etc.

L'Estat espanyol és un dels països en què es consumeix més carn de porc (66 % del total de carn consumida). A la Xina el consum de carn de porc representa un 34 % del total de la carn consumida; a la Unió Europea representa el 44 %, als EUA el 31 %, al Regne Unit el 25 % i a Alemanya el 54 %. L'Estat espanyol, juntament amb Alemanya, són els països líders en la producció de carn de porcí. Les aproximadament 25.000-26.000 truges (mares) presents als centres de multiplicació de cadascun d'aquests dos països contrasten amb el cens de mares a França (15.000), a Itàlia (9.000) i a Bèlgica (6.000). Així doncs, l'Estat espanyol és un dels principals consumidors i productors de carn de porc i, en aquest sentit és, juntament amb Alemanya, un dels principals exportadors de la Unió Europea.

TÈCNiques D'ANÀLISI SEMINAL

Per a l'anàlisi de la qualitat espermàtica (concentració, morfologia i motilitat espermàtiques) s'utilitza un sistema automàtic d'anàlisi seminal (CASA, Computer Assisted Semen Analysis) (ISAS, Integrated Semen Analysis System). Diverses cases comercials (Microptic SL, Minitüb Ibèrica SL, IMV Technologies, etc.) ofereixen equips integrats, dotats d'un microscopi amb contrast de fases, d'una càmera de vídeo digital i d'un programa específic d'anàlisi d'imatge. Especialment interessant és la informació que ofereixen aquests sistemes pel que fa a la qualitat del moviment dels espermatozoides, que distingeixen en-

tre velocitat curvilínia (VCL), velocitat lineal (VSL), velocitat mitjana (VAP), linealitat de la trajectòria ($LIN = VSL/VCL$), rectitud de la trajectòria ($STR = VSL/VAP$), oscil·lació de la trajectòria ($WOB = VAP/VCL$), freqüència de batuda de la cua (BCF) i desplaçament lateral del cap (ALH). La morfologia espermàtica, és a dir, la classificació i recompte percentual d'espermatozoides madurs, immadurs (amb gota proximal o distal) i aberrants (de cua o de cap), s'examina també al microscopi de contrast de fase i amb un CASA (vegeu la figura 1) (Bonet *et al.*, 2000; Bassols *et al.*, 2004, 2005).

La viabilitat espermàtica, és a dir, el percentatge d'espermatozoides viables i no viables, sol determinar-se a partir de la coloració amb fluorocroms i l'anàlisi posterior mitjançant microscòpia òptica de fluorescència o citometria de flux. Especialment interessants són els resultats obtinguts amb els fluorocroms iodur de propidi i diacetat de carboxifluoresceïna amb microscòpia de fluorescència (vegeu la figura 2), i els fluorocroms iodur de propidi i SYBR-14 amb citometria de flux (vegeu la figura 3) (Bussalleu *et al.* 2008).

La integritat de les membranes plasmàtica, acrosòmica i mitocondrial (vegeu la

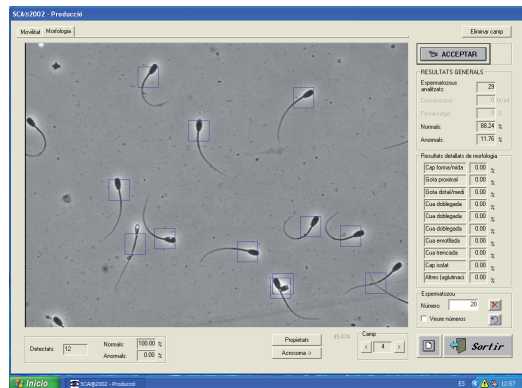


FIGURA 1. Anàlisi de la morfologia espermàtica al microscopi de contrast de fase i amb l'ajut del sistema CASA.

figura 4) és avaluada a partir de la múltiple tinció amb els fluorocroms bisbenzamida (DNA blau, cèl·lules viables), iodur de propidi (DNA vermell, cèl·lules no viables), Mitotracker Green FM (beina mitocondrial, verd intens, integritat) i Alexa Fluor 488 (acrosoma, verd poc intens, intacte) (Bussalleu *et al.*, 2005; Pruneda *et al.*, 2006).

La resistència dels espermatozoides als xocs osmòtics (vegeu la figura 5) es posa de

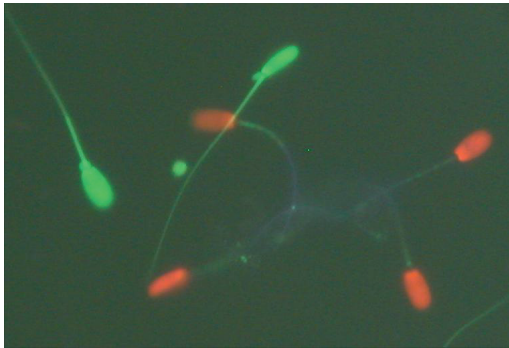


FIGURA 2. Anàlisi de vitalitat espermàtica al microscopi de fluorescència amb els fluorocroms iodur de propi-

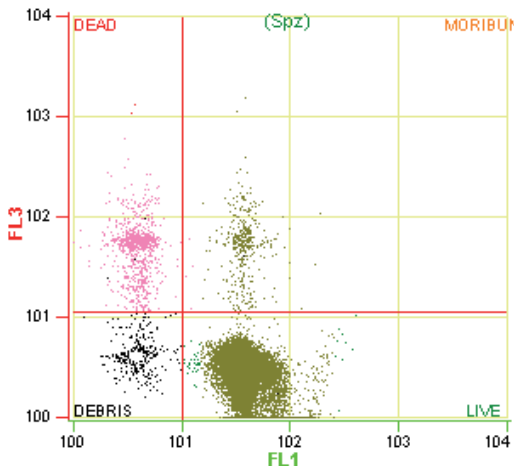


FIGURA 3. Anàlisi de la vitalitat espermàtica al citòmetre de flux utilitzant els fluorocroms iodur de propidi (IP) i SYBR-14.

manifest després de sotmetre les cèl·lules a medis hipoosmòtics i isoosmòtics i avaluar, per microscòpia de contrast de fases, la integritat funcional de la membrana plasmàtica (HOST, *hyposmotic swelling test*) o de la membrana acrosòmica (ORT, *osmotic resistance test*) (Medrano *et al.*, 2006).

La integritat o fragmentació del DNA és

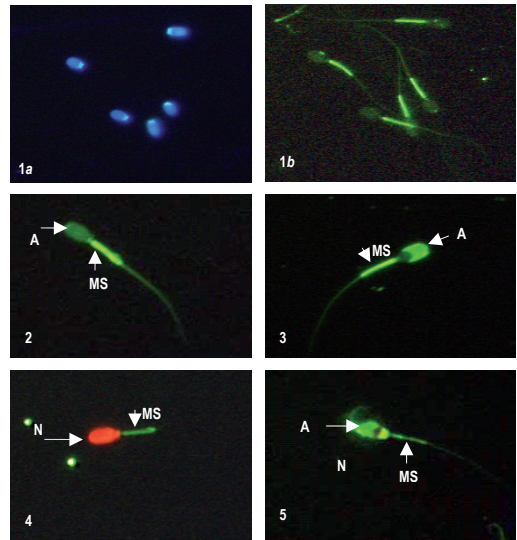


FIGURA 4. Anàlisi de la integritat de membranes al microscopi de fluorescència mitjançant el marcatge múltiple amb els fluorocroms bisbenzamida (DNA, blau, cèl·lules viables), iodur de propidi (DNA, vermell, cèl·lules no viables), Mitotracker Green FM (beina mitocondrial, verd intens, integritat) i Alexa Fluor 488 (acrosoma, verd dèbil, intacte). 1) Espermatozoides viables amb l'acrosoma i la beina mitocondrial intactes. Els nuclis dels espermatozoides viables emeten una fluorescència blava intensa (1a), i els seus acrosomes i beines mitocondrials estan intactes i emeten una fluorescència verda dèbil i moderada (respectivament) (b). 2) Espermatozoide viable amb l'acrosoma intacte (A) i la beina mitocondrial intacta (MS). 3) Espermatozoide viable amb l'acrosoma reaccionat (A) i la beina mitocondrial intacta (MS). 4) Espermatozoide no viable amb l'acrosoma intacte i la beina mitocondrial intacta (MS). La intensa fluorescència vermella del nucli (N) emmascara la fluorescència verda i dèbil de l'acrosoma intacte. 5) Espermatozoide no viable amb l'acrosoma reaccionat (A), la beina mitocondrial alterada (MS) i el nucli amb fluorescència vermella (N).

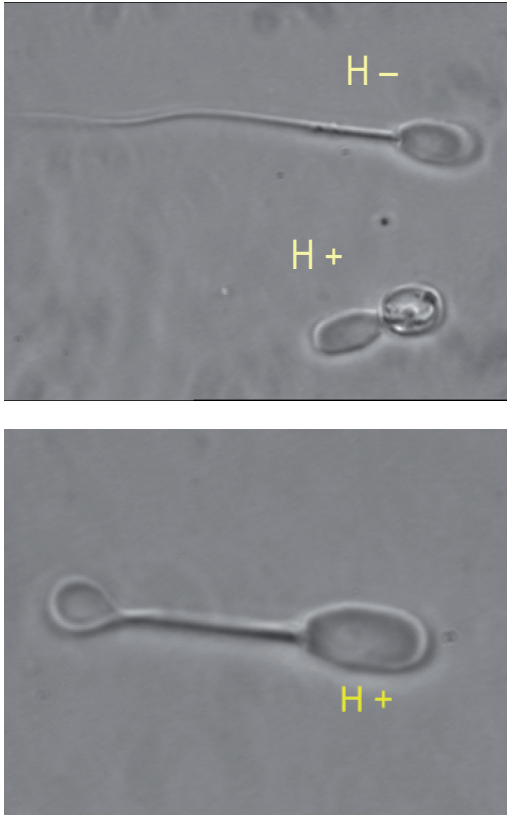


FIGURA 5. Test d'endosmosi (HOST o *hyposmotic swelling test*) per mesurar la integritat funcional de la membrana plasmàtica.

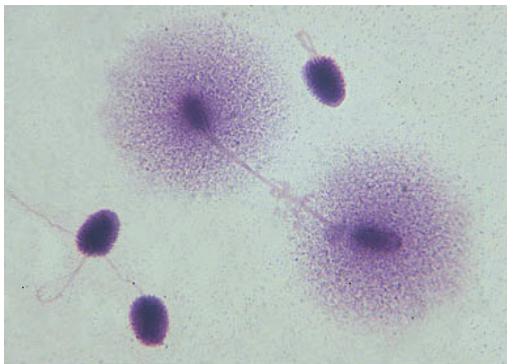


FIGURA 6. Test SCD (*sperm chromatin dispersion*) a partir de la tinció Wright per a microscòpia òptica.

avaluada a partir del test SCD (*sperm chromatin dispersion*). Aquesta tècnica presenta dues possibles variacions en funció de si s'utilitza la tinció de Wright (vegeu la figura 6) per al microscopi òptic de camp clar o la tinció amb fluorocroms (CCF-RG) per al microscopi de fluorescència (vegeu la figura 7) (Flores *et al.*, 2008).

Per al control sanitari del semen, és dir, la determinació de contaminació vírica (virus d'Aujeszky, PRRS, etc.) o bacteriana (*Escherichia*, *Brucella*, etc.), s'utilitza la PCR convencional o la PCR-RT, perquè ofereixen, respecte d'altres mètodes d'anàlisi (cultius, serologia, etc.) més rapidesa i més precisió (vegeu la figura 8) (Bonet *et al.*, 2006).

La determinació de proteïnes solubilitzades (senyalització cel·lular) s'estudia a partir de tècniques electroforètiques d'alta especificitat, com la transferència *western* (*immunoblotting*) (vegeu la figura 9) (Bonet *et al.*, 2006; Bassols *et al.*, 2007; Sancho *et al.*, 2007).

El poder fecundant del semen sol determinar-se, *in vitro*, pel test de fecundació homòloga (o heteròloga) d'òcits. En porcí s'ha demostrat que no hi ha una bona correlació entre el poder fecundant *in vitro* del

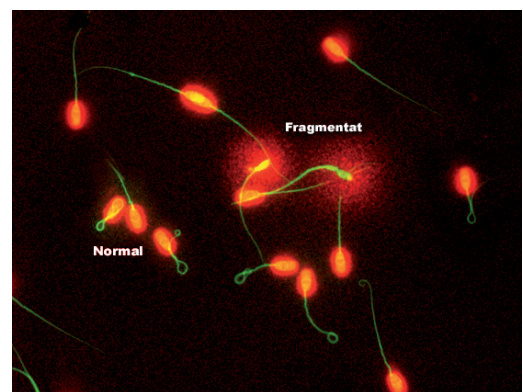


FIGURA 7. Test SCD (*sperm chromatin dispersion*) a partir de tinció amb fluorocroms (CCF-RG) per a microscopi de fluorescència (Sperm-Sus-Halomax).

semen i la fertilitat *in vivo*. En aquesta espècie, el test de penetració homòloga de la zona pellúcida d'òcits immadurs s'utilitza en treballs de recerca bàsica relacionats amb els processos de reconeixement espermatozoide-òocit, de reacció acrosòmica, de penetració de la zona pellúcida, etc. (Bonet et al., 2006).

TÈCNiques DE REPRODUCCIÓ ASSISTIDA

Les principals tècniques de reproducció assistida utilitzades en l'espècie porcina són: la inseminació artificial, la criopreservació espermàtica, la fecundació *in vitro*, la

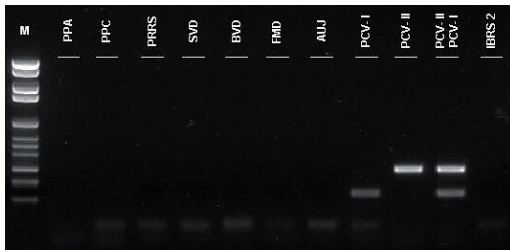


FIGURA 8. PCR múltiple per a detecció de circovirus porcí (PCV).

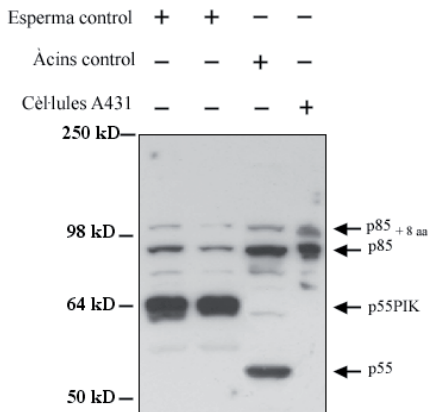


FIGURA 9. Anàlisi de proteïnes solubilitzades amb transferència *western* (immunoblotting).

fecundació assistida, la vitrificació embrionària, la transferència embrionària, el sexatge de semen i d'embrions, el clonatge reproductiu i terapèutic i la transgènesi.

La inseminació artificial (IA) en porcí es pot practicar dipositant les dosis seminals a tres nivells: cervical, postcervical i intrauterí. Tradicionalment, la IA cervical (convencional) s'utilitza per a dosis de semen refrigerat i la IA intrauterina (profunda) es reserva per a dosis seminals descongelades o sexades (vegeu la figura 10). Recentment, es va estenent la pràctica de la IA postcervical, tant per a dosis seminals refrigerades com descongelades, pels avantatges que ofereix respecte a la IA convencional o la IA intraterina, respectivament. En la IA postcervical, en comparació de la IA convencional, es redueix el volum de la dosi seminal

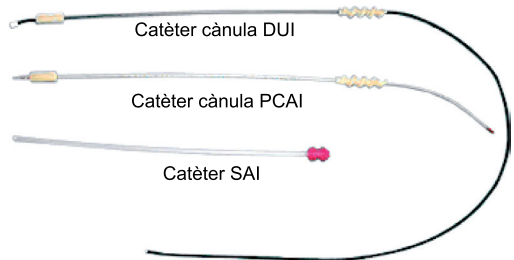
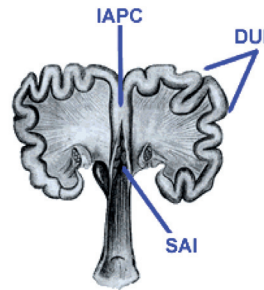


FIGURA 10. Esquema del lloc de deposició del semen a l'úter i dels diversos tipus de catèter (IA, convencional o SAI; IA, postcervical o PCAI; IA, intrauterina profunda o DUI).

refrigerada (30 ml vs. 80-100 ml) i la concentració espermàtica (1×10^9 espermatozoides vs. 3×10^9 espermatozoides); és a dir, l'ús de la IA postcervical permet optimitzar costos i mantenir uns bons resultats en termes de fertilitat i prolificitat. La pràctica de la IA intrauterina per a semen descongelat presenta un punt feble que en limita l'ús rutinari: la complexitat anatòmica de l'úter d'una truja i la necessitat d'expertesa en el maneig del catèter utilitzat són dos factors limitants del seu ús. Tradicionalment, per a IA intrauterina una dosi seminal descongelada sol contenir unes 3-4 palletes de 0,5 ml amb $0,5 \times 10^9$ espermatozoides/palleta; actualment s'estan practicant inseminacions amb catèters postcervicals (IA postcervical) amb dosis seminals que contenen sis palletes de 0,5 ml amb $0,5 \times 10^9$ espermatozoides/palleta. Els bons resultats obtinguts, en termes de fertilitat, i la facilitat d'ús del catèter postcervical, fan que una de les línies de recerca actualment més demanades pel sector porcí sigui l'optimització de la IA postcervical per a semen descongelat.

La criopreservació espermàtica en porcí està especialment indicada per a l'exportació i importació de semen, per a la creació de bancs de germoplasma i per a la millora de la planificació de les inseminacions. Cal tenir present que la fertilitat i la prolificitat obtingudes amb semen descongelat i IA intrauterina són sensiblement inferiors a les que s'obtenen amb semen refrigerat i IA convencional. A més, s'observa una elevada variabilitat entre mascles reproductors pel que fa a la qualitat del semen descongelat, i es distingeix entre mascles *bons congeladors de semen* i mascles *mals congeladors de semen*. Les causes d'aquest empobriment del semen descongelat recauen en la característica composició del plasmalema de l'espermatozoide de porcí, molt ric en fosfolípids insaturats i pobre en colesterol. La criopreservació espermàtica provoca una pèrdua

de la permeabilitat selectiva, la formació de radicals ROS, la desorganització dels dominis de membrana, la disminució de la qualitat espermàtica (en termes de motilitat i viabilitat) i la criocapacitació prematura (reacció acrosòmica prematura i pèrdua de la capacitat de reconeixement espermatozoide-oòcit). Aquests efectes en el semen descongelat provoquen una disminució de les taxes de fecundació *in vivo* i, en conseqüència, una subfertilitat expressada en uns índexs baixos de fertilitat i prolificitat. Les investigacions actuals es dirigeixen envers la determinació de marcadors moleculars que puguin ser considerats com a indicadors de congelabilitat (Pruneda *et al.*, 2007b).

La fecundació *in vitro* (FIV), la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), la vitrificació embrionària i la transferència embrionària (TE) són pràctiques reservades a la recerca i, actualment, no utilitzades com a tècniques reproductives de camp. La FIV és una tècnica molt ben adaptada en porcí i amb excel·lents resultats; es procedeix a la dissecció d'ovaris i a l'aspiració d'oòcits immadurs, a la maduració *in vitro*, al cocultiu d'oòcits i d'espermatozoides (38,5 °C, 5 % CO₂ i 95-100 % d'humitat) i al cultiu dels embrions durant nou dies, abans de la transferència o vitrificació. La vitrificació embrionària es duu a terme segons el mètode de l'*open pulled straw* (OPS). La vitrificació permet la creació de bancs de germoplasma, facilita i minimitza els costos del transport d'animals i redueix el risc sanitari associat al transport d'animals vius entre països. Per contra, la vitrificació embrionària en porcí ha de millorar els resultats en termes de supervivència embrionària i d'èxit en la transferència embrionària no quirúrgica (la TE d'embrions frescos ofereix una taxa de part del 70,8 % i unes camades de 6,9 garrins, mentre que la TE d'embrions desvitrificats només assoleix una taxa de part del 42,9 % i unes camades de

5,4 garrins). La transferència embrionària es practica per via no quirúrgica, amb un catèter intrauterí i amb embrions en estadi de mòrula o blastocist (jove o expandit).

Per al sexatge d'embrions s'aïllen alguns blastòmers i es determina la presència o absència del cromosoma Y amb tècniques citogenètiques (cariotip), PCR o tècniques d'hibridació *in situ*. El sexatge d'embrions ofereix una elevada eficiència i condueix a una desviació del 100 % de la proporció de sexes embrionària. Per contra, el sexatge d'embrions en porcí està associat a unes baixes eficiències de la vitrificació embrionària i de la TE. A més, la International Embryo Transfer Society ha recomanat no fer ús del sexatge d'embrions, pel risc sanitari que comporta la manipulació de la zona pellúcida.

El sexatge de semen es fa a partir del diferent contingut de DNA dels espermatozoides portadors del cromosoma X i del cromosoma Y, tenyits amb Hoechst 33342. La separació física d'ambdues poblacions s'aconsegueix per citometria de flux associada a un *sorter*. El *sperm sorting* en porcí presenta, avui dia, rendiments situats entre el 75-80 % i una baixa velocitat de sortida, que dificulta l'ús de l'esperma sexat en la pràctica rutinària de la inseminacions artificials de les granges.

El clonatge reproductiu en porcí es practica en treballs de recerca a partir de la separació de blastòmers en estadi de mòrula i l'evolució embrionària posterior dels blastòmers aïllats. Per al clonatge terapèutic es procedeix a la transferència d'un nucli procedent d'una cèl·lula donant a un ooplasma receptor, és a dir, a un oòcit enucleat prèviament.

La transgènesi en porcí s'aconsegueix per: a) transferència directa mitjançant la microinjecció de DNA (transgèn) en oòcits o espermatozoides, b) per transferència indirecta mitjançant la infecció amb retrovi-

rus (RNA) (transgèn) a oòcits o espermatozoides, i c) per manipulació (eliminació o substitució) d'un gen en cèl·lules mare que donen lloc a porcs que no tenen un gen (*genoanullat*). Els porcs transgènics obtinguts per transferència de material genètic estrany (DNA o RNA) (transgèn) són creats, fonamentalment, per obtenir bioreactors (productors de proteïnes humanes). Els porcs transgènics genoanullats solen ser creats per a xenotrasplantaments o per obtenir models clínics per estudiar diverses malalties.

L'empresa PPL Therapeutics, a Virginia (EUA), ha obtingut el 2007 porcs genoanullats per a xenotrasplantaments. Han obtingut porcs per transferència nuclear (de fibroblasts fetals a oòcits enucleats) que tenen desactivat el gen que provoca el rebuig d'implants d'òrgans de porc a éssers humans (xenotrasplantaments). Una vegada eliminat el gen que codifica l' α 1-3-galactosil-transferasa s'obtenen porcs transgènics que no presenten residus de galactosa en els seus endotelis i, en conseqüència, són menys proclius al rebuig agut de xenotrasplantaments. Els xenotrasplantaments presenten un risc de transmissió de virus de l'espècie porcina a la humana. Els *minipigs* o *micropigs* (Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario de Aranjuez) són especialment utilitzats per als xenotrasplantaments per la seva facilitat de maneig i menor cost de producció.

La Universitat de Pittsburg (EUA) va crear el 2007 porcs transgènics amb àcids grassos omega-3. Després de la transferència d'un gen (transgèn) procedent del cuc *Caenorhabditis elegans* a cèl·lules fetals de porc i el clonatge posterior d'aquestes en oòcits (i la transferència embrionària), es van obtenir dotze porcs, dels quals sis eren portadors del gen capaç de sintetitzar àcids grassos omega-3. D'aquesta manera s'han creat uns porcs amb greix ric en omega-3, un

àcid gras present en peixos i d'efectes beneficiosos per als pacients afectats de malalties cardiovasculars. Malgrat que actualment no és legal la producció d'animals transgènics per al consum humà, la FDA als EUA podria aprovar properament la comercialització d'aquesta modalitat de porcs transgènics si es demostra que el seu consum no és perjudicial per a la salut.

La Universitat d'Agricultura Nord-oriental de Pequín (Xina) ha creat el 2008 porcs transgènics que emeten llum verda fluorescent. S'ha procedit a la introducció d'un fragment de DNA (transgèn) que codifica una proteïna fluorescent en cèl·lules fibroblàstiques d'un embrió. El nucli modificat d'aquestes cèl·lules ha estat transferit a un oòcit enucleat i, practicada la transferència embrionària d'aquest embrió transgènic, ha nascut una truja transgènica fluorescent. Aquesta truja transgènica ha estat encreuada amb un mascle normal i el resultat d'aquest aparellament han estat dos garrins que també emeten llum fluorescent. Els ungles, el morro i la llengua dels dos garrins (d'una camada d'onze) brillen en la foscor, igual com li passa a la seva mare (vegeu la figura 11).

En definitiva, l'Estat espanyol és un dels cinc primers motors de la producció porcina mundial i ofereix una recerca de referència internacional en l'àmbit de la biotecnologia reproductiva en porcí.

logia reproductiva en porcí. Els principals objectius de la recerca en aquest camp són: a) incrementar el rendiment reproductiu i estabilitzar-lo al llarg de la vida reproductiva dels mascles, i b) incrementar la seguretat sanitària i genètica.

BIBLIOGRAFIA

- BASSOLS, J.; BONET, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX J. L. (2007). «Proteomic study of the establishment of boar epididymal cellcultures». *Theriogenology*, 68: 76-86.
- BASSOLS, J.; KÁDÁR, E.; BRIZ, M.; PINART, E.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. (2004). «In vitro culture of epithelial cells from caput, corpus and cauda epididymis of *Sus domesticus*». *Theriogenology*, 62: 929-942.
- BASSOLS, J.; KÁDÁR, E.; BRIZ, M.; PINART, E.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; CASAS, I.; DACHEUX, J. L.; BONET, S. (2005). «Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures. Evaluation of boar sperm maturation *in vitro*». *Theriogenology*, 64: 1995-2009.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E. (2000). *Morfología espermática en porcino (Morphology of boar spermatozoa) (Morfología espermática en porcí)*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans.
- BONET, S.; MARTÍNEZ, E.; RODRÍGUEZ, J. E.; BARRERA, X. (2006) *Biotecnología de la reproducción porcina. Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*. Barcelona: Universitat de Girona, Red Temática de la Reproducción Porcina.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; RIVERA, M. M.; ARIAS, X.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCÍA-GIL, N.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; YESTE, M.; CASAS, I.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. (2008). «Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns». *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 48-52.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; CASAS, I.; BONET, S. (2005). «Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to asses the functional status of boar spermatozoa». *Microscopy Research and Technique*, 63: 277-283.
- FLORES, E.; CIFUENTES, D.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.;



FIGURA 11. Porcs procedents d'una mateixa camada, un amb el morro verd fluorescent i l'altre amb el morro normal.

- MEDRANO, A.; BONET, S.; BRIZ, M. D.; PINART, E.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2008). «Freezing/Thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overwall structure in boar sperm». *Theriogenology*, 69: 1083-1094.
- MEDRANO, A.; GARCIA-GIL, N.; RAMÍO, L.; RIVERA, M. M.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; RAMÍREZ, A.; PEÑA, A.; BRIZ, M. D.; PINART, E.; CONCHA, I. I.; BONET, S.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2006). «Hexose-specificity of hexokinase and ADP-dependence of pyruvate kinase play important roles in the control of monosaccharide utilization in freshly diluted boar semen». *Molecular Reproduction and Development*, 73: 1179-1194.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BONET, S.; YEUNG, C. H.; COOPER, T. (2006). «Study of the polyol pathway in the porcine epididymis». *Molecular Reproduction and Development*, 73: 859-865.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDÁR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. (2005). «Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars». *Theriogenology*, 63: 2219-2232.
- PRUNEDA, A.; YEUNG, C. H.; BONET, S.; PINART, E.; COOPER, T. G. (2007). «Concentrations of carnitine, glutamate, myo-inositol and sorbitol in epididymal fluid and spermatozoa from boars: comparison of two different semen collection frequencies». *Animal Reproduction Science*, 97: 344-355.
- SANCHO, S.; CASAS, I.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; EK WALL, H.; SARAVIA, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; FLORES, E.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. (2007). «Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs». *Reproduction*, 134: 111-121.