



Aplicaciones prácticas de la producción de embriones *in vitro* en la especie caprina¹ *Practical applications of in vitro embryo production in goats*

Hernan Baldassarre

Pharmathene Canada Inc., 320 St. Georges, St. Telesphore, Quebec J0P 1Y0, Canada
Correspondencia: hbaldassarre@pharmathene.ca

Resumen

La tecnología de aspiración de ovocitos por laparoscopia seguida de producción de embriones *in vitro* y transferencia embrionaria, es examinada en esta revisión de nuestros trabajos de los últimos 8 años, con especial atención a las aplicaciones prácticas en las que la plataforma ofrece ventajas significativas respecto de otros procedimientos para multiplicar hembras sobresalientes. Comparada con la superovulación y transferencia embrionaria tradicional (MOET), la plataforma ofrece mayor consistencia y efectividad al evitar las 3 causas mayores de fracaso en la MOET. La aplicación con mayor potencial para el desarrollo futuro es su utilización en la multiplicación exponencial de hembras prepúberes de alto valor genético, que agrega la ventaja de acelerar el progreso genético al acortar el intervalo generacional, y la ventaja de altas respuestas a los tratamientos hormonales para estimular el desarrollo folicular. Otras aplicaciones interesantes discutidas en detalle en esta revisión incluyen la propagación de hembras de edad avanzada que han sufrido un deterioro de su fertilidad, y la producción de óvulos y cigotos para utilización en biotecnologías reproductivas avanzadas (transgenesis y clonación).

Palabras clave: laparoscopia, foliculocentesis, prepúber

Abstract

Laparoscopic Ovum Pick-up followed by in vitro embryo production is examined in this review of our results in the last 8 years, with special attention to the practical applications in which this production platform offers significant advantages over other procedures for the multiplication of outstanding female goats. Compared to MOET, this platform offers greater efficacy and consistency partly because it avoids the three main causes of MOET failure. The application with more potential for development appears to be the utilization for the exponential reproduction of females of high genetic value at prepubertal ages, which adds the advantages of accelerating genetic progress by means of shortening the generation interval and outstanding response to gonadotropin treatments for follicular development. Other applications of interest additionally discussed in this paper include the reproductive rescue of older goats and goats with acquired fertility issues, and the production of oocytes and zygotes for use in advanced reproductive biotechnologies (transgenesis and cloning).

Keywords: LOPU, laparoscopy, prepubertal

Introducción

En pequeños rumiantes, la aspiración de ovocitos por laparoscopia (AOL) seguida de producción de embriones *in vitro* (PEIV) y transferencia embrionaria (TE), ha sido señalada por diversos autores como la forma más eficiente de producir una mayor cantidad de hijos a partir de hembras de genética y productividad sobresaliente (Baldassarre *et al.*, 1994; Tervit, 1996; Baldassarre y Karatzas, 2004; Cognié *et al.*, 2004). En programas de mejoramiento genético, esto permite incrementar el diferencial de selección y de esa manera acelerar la velocidad del progreso genético.

La recuperación de ovocitos por laparoscopia fue descrita por primera en 1974 (Snyder y Dukelow, 1974). Dichos autores aspiraron 23 folículos y recuperaron 6 ovocitos de una oveja, bajo observación laparoscópica. Sin embargo, el interés por el completo desarrollo de esta plataforma de producción de embriones en los pequeños rumiantes no se desarrolló por completo hasta mediados de los '90, conjuntamente con el desarrollo de la tecnología de producción de embriones *in vitro* (Baldassarre *et al.*, 1994; Graff *et al.*, 1999; Baldassarre *et al.*, 2002; Cognié *et al.*, 2003, 2004).

Comparada con la ovulación múltiple y transferencia embrionaria (MOET), el método más tradicional para la multiplicación exponencial de hembras sobresalientes, la producción de embriones *in vitro* ofrece numerosas ventajas (Tervit, 1996; Baldassarre *et al.*, 2002; Baldassarre y Karatzas, 2004; Cognié *et al.*, 2004). El objetivo principal de este manuscrito será proveer una descripción de los detalles técnicos asociados con esta plataforma de producción de embriones, con especial atención a la discusión de las aplicaciones prácticas en las

¹Palestra presentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 2 de junho de 2007, Curitiba/PR.

cuales esta tecnología ofrece ventajas sobresalientes respecto de otros métodos de reproducción asistida en caprinos.

Materiales y Metodos

Preparación de donantes

Si bien la AOL sin estimulación hormonal ha sido descrita en pequeños rumiantes (Stangl *et al.*, 1999), a los efectos de obtener una máxima respuesta es altamente recomendable preparar las donantes con un tratamiento hormonal que sincronice su ciclo estrual y estimule el desarrollo folicular. Esto permite disponer de una gran cantidad de folículos sincronizados en un estadio deseable desarrollo (2-5mm de diámetro), en el momento pre-determinado para la AOL. A tal efecto, la sincronización de celo se realiza con esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Veramix®, Laboratorios Upjohn, Canadá) por espacio de 10 días, conjuntamente con la administración de 125 µg de cloprostenol (Estrumate®, Laboratorios Malinkrodt, Canadá) dos días antes de la laparoscopia. Las esponjas se retiran durante la AOL. Múltiples estrategias para la estimulación hormonal de donantes de ovocitos han sido publicadas por nuestro grupo (Baldassarre *et al.*, 1996, 2002). En dichos trabajos, protocolos de inyecciones múltiples de hormona folículo-estimulante (FSH; Folltropin®, Bioniche, Canadá) fueron comparados con protocolos en los que la FSH se combinó con la administración de gonadotropina coriónica equina (eCG; Pregnenol®, Bioniche, Canadá) en una única inyección administrada ~36 horas antes de la AOL (protocolo "OneShot"). Como los resultados no demostraron ninguna diferencia significativa entre los tratamientos de inyecciones múltiples y los tratamientos "OneShot", nuestro grupo ha adoptado hace años el protocolo "OneShot" como nuestro protocolo standard debido a su simplicidad y excelentes resultados. En el caso de animales prepúberes, los protocolos son idénticos a los utilizados en adultos, con la única diferencia de que no requieren recibir el tratamiento de sincronización de celo (esponja intravaginal + luteolítico) debido a que no están ciclando y entonces no requieren ser sincronizadas.

La preparación de las cabras para la AOL se completa con un ayuno de no menos de 24 horas, no solamente para evitar complicaciones asociadas a la anestesia, sino también para disminuir al mínimo la incidencia de regurgitaciones ruminales intraoperatorias debido a la posición de trabajo durante la laparoscopia.

Aspiración de ovocitos por laparoscopia (AOL)

La AOL se realiza bajo anestesia general. En nuestro caso utilizamos una combinación de ketamina (5 mg/Kg, Ketalean®, Bimeda-MTC, Canadá) y diazepam (0.35 mg/Kg; Diazepam®, Sabex, Canadá) para realizar la inducción y proceder con la intubación endotraqueal, para luego continuar la operación bajo anestesia inhalatoria con isofluorano. Una vez anestesiado, el animal es colocado en la clásica camilla laparoscópica (Evans y Maxwell, 1987), afeitado y desinfectado en la zona abdominal inmediatamente craneal a la ubre. Para la AOL el animal es colocado cabeza abajo en un ángulo aproximado de 45-60 grados respecto de la horizontal, de tal modo que los órganos digestivos se recuesten sobre el diafragma y permitan visualizar el tracto reproductivo de la hembra. Actualmente estamos utilizando un set de laparoscopia (Richard Wolf, Alemania) compuesto por un endoscopio de 5 mm de diámetro, asociado con instrumentos de 3.5 mm de diámetro, con sus respectivos trocares para poder acceder a la cavidad abdominal, lo que nos permite realmente minimizar el grado de trauma quirúrgico. Para incrementar la capacidad de visualización vía laparoscopia, se realiza un pneumoperitoneo, insuflando la cavidad abdominal con aire filtrado o CO₂. La pipeta de aspiración es de fabricación casera en nuestro laboratorio y está compuesta por tubo de acrílico transparente de 3 mm de diámetro exterior y 1 mm de diámetro interior, al cual le "pegamos" una aguja 20G bisel corto en una extremidad. El otro extremo de la pipeta se conecta a través de una tubuladura de silicona con el tubo de recolección (tubo Falcon de 50 mL) el que a su vez está conectado con la bomba de vacío. La presión de vacío se gradúa con una llave de flujo, de tal modo que la aspiración de medio sea a una velocidad de 50-70 gotas por minuto. Una vez que los 3 trócares han sido debidamente insertados y hemos introducido a través de ellos el laparoscopio, la pinza de sujeción atraumática y la pipeta de aspiración, se procede con la punción folicular. A los efectos de poder visualizar y punzar todos los folículos de más de 2 mm presentes, el ovario es descubierto levantando la fimbria con la pinza atraumática y tirando en diferentes direcciones, como para exponer las distintas áreas en su superficie. El procedimiento se repite en ambos ovarios, y antes de retirar el equipamiento se procede a lavar ambos ovarios con solución fisiológica heparinizada, a los efectos de eliminar cualquier resto de sangre y así minimizar los riesgos de secuelas (adherencias). El medio de aspiración que utilizamos está compuesto por medio 199 suplementado con 0.05 mg/mL de heparina (Hepalean®, Organon Teknica, Canadá) y 1% (v/v) de suero fetal bovino (Sigma).

Maduración, fertilización y cultivo in vitro

De no ser indicado explícitamente, todos los reactivos utilizados para los procedimientos *in vitro* fueron obtenidos de la compañía Sigma Chemical (St. Louis, USA).

Los procedimientos utilizados en las distintas etapas de la producción de embriones *in vitro* han sido ya descritos en extensión por nuestro grupo (Baldassarre *et al.*, 2002, 2003, 2004b), así como también otros grupos trabajando con caprinos (Younis *et al.*, 1991; Cognie *et al.*, 2004; Cox y Alfaro 2007). Brevemente, digamos que la maduración *in vitro* de los ovocitos se realiza medio 199 suplementado con LH (0.02 U/mL; Sioux Biochemicals, USA), FSH (0.02U/mL; Sioux Biochemicals, USA), estradiol 17 β (1 μ g/mL), piruvato sódico (0.2 mM), 10 mg/mL gentamicina (Gibco), 100 μ M cisteamina y 10% suero de cabra en celo (inactivado por calor), en gotas de 50 μ L bajo aceite mineral, en incubadora humidificada, a 38.5°C en una atmósfera de 5% CO₂ por espacio de 24 a 27 horas. Luego de la maduración, los ovocitos son desprovistos parcialmente de sus células del cumulus mediante pipeteado, lavados, y transferidos a gotas de 40 μ L de medio de fertilización bajo aceite mineral. El medio de fertilización consiste en medio TALP (Parrish *et al.*, 1986) suplementado con 0.2 mM de piruvato sódico y 20% suero de cabra en celo. Con respecto a la preparación del semen, a lo largo de los años hemos utilizado semen fresco y congelado. En el balance se puede decir que el semen congelado es preferido ya que permite mayor consistencia en los resultados una vez que se encuentran las condiciones de capacitación ideales. En líneas generales, el semen fresco siempre necesita capacitación química, mientras que en el caso del semen congelado muchas veces el proceso de congelamiento-descongelamiento es suficiente para inducir capacitación y reacción acrosómica (Perez *et al.*, 1996).

En el caso de que sea necesario realizar la capacitación química, protocolos a base de heparina sola (Cognié *et al.*, 2004; Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2004) o en combinación con ionomicina y 8-bromo-cAMP (Wang *et al.*, 2002; Baldassarre *et al.*, 2002), han sido utilizados con éxito en la capacitación de semen caprino con miras a la fertilización *in vitro*. En cualquiera de los casos, el procesamiento del semen comienza con un lavado por gradiente de Percoll (45:90%) en centrifuga a 500 x g por espacio de 30 minutos, para enriquecer la muestra seminal en porcentaje de células móviles. El pellet es luego resuspendido en mDM y re-centrifugado x 10 minutos a 500 x g. El mDM es el Defined Médium (Younis *et al.*, 1991) suplementado con 10% suero de cabra en celo. Finalmente, el pellet se resuspende en mDM a una concentración final de 30 x 10⁶ espermias/mL y 5 μ L de esta suspensión se siembran en la gota de medio de fertilización donde se pusieron los ovocitos (150.000 espermias/gota). La fertilización se realiza en incubadora humidificada, a 38.5°C en una atmósfera de 5% CO₂. Luego de 16-18h, los presuntos cigotos son transferidos a gotas de 50 μ L medio de cultivo compuesto por medio SOF (Tervit *et al.*, 1972) suplementado con 1 mM glutamina, 2% BME aminoácidos esenciales, 1% MEM aminoácidos no esenciales y 8 mg/mL albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos. El cultivo se realiza en incubadora humidificada, a 38.5°C en una atmósfera de 5% CO₂, 7% O₂ y 88% N₂. La duración del cultivo dependerá del interés del proyecto. Para transferencias uterinas y para proyectos destinados a la producción de embriones para congelamiento, el cultivo se realiza por espacio de ~6 días, mientras que para el caso de transferencias al oviducto, el cultivo es por menos de 48 horas.

Transferencia a receptoras

Nuestro grupo trabaja exclusivamente transfiriendo los embriones a receptoras dentro de las 48h de la inseminación de los ovocitos (Baldassarre *et al.*, 2002, 2004b, 2007). Esto es principalmente porque estamos convencidos que a través de este mecanismo evitamos muchos de los problemas de desarrollo asociados con el cultivo *in vitro* prolongado (McEvoy *et al.*, 2000). Para ello las receptoras son sincronizadas para que su día estimado de celo coincida con el día de la FIV, usando un protocolo de sincronización de celo similar al descrito para las donantes, juntamente con 400-500 UI de eCG administradas al momento de retirar las esponjas para estimular el desarrollo folicular y 100 μ g GnRH a las 36 horas de retiradas las esponjas para sincronizar la ovulación. La transferencia se realiza en forma quirúrgica, por laparotomía mediana bajo anestesia general. Previo a ejecutar la laparotomía, las receptoras son evaluadas por laparoscopia a los efectos de visualizar la presencia de al menos un cuerpo hemorrágico en uno de los ovarios. Una vez que el tracto reproductivo ha sido exteriorizado, los embriones son implantados utilizando un catéter TomCath (Sovereign, Canadá) introducido dentro del oviducto a través de la fimbria. Para el caso de la transferencia al útero de estadios embrionarios mas avanzados, se realiza una laparotomía mediana con asistencia laparoscópica para exteriorizar el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo presente, y se implantan los embriones en el tercio tubárico del cuerno, también usando un catéter TomCath (Cognie *et al.*, 2004; Cox and Alfaro, 2007). Las receptoras son escaneadas por ultrasonografía a las 4 y 8 semanas post-transferencia usando un ecógrafo SonoVet® 600 (Medison Corp., Korea) equipado con transductor transrectal de 5 Mhz.

Aplicaciones de la técnica y resultados

El uso de esta tecnología en aquellas aplicaciones en las que tiene una ventaja adicional o una eficiencia sobresaliente respecto de los métodos tradicionales, es esencial para que pueda tener una mayor penetración en el mercado la reproducción asistida en caprinos. En las secciones que siguen a continuación se describen algunas aplicaciones en las que la plataforma de producción *in vitro* de embriones caprinos, a partir de ovocitos recolectados por laparoscopia, tiene una clara ventaja diferencial sobre otros métodos. En todos estos casos, la mayor desventaja es el hecho de que se trata de una técnica que demanda entrenamiento, infraestructura y equipamiento costoso y altamente especializado.

Como alternativa a la MOET tradicional

La aspiración de ovocitos por laparoscopia seguida de producción de embriones *in vitro* y transferencia embrionaria ofrece ventajas significativas respecto de la MOET tradicional. Por un lado, la AOL es menos traumática que los protocolos convencionales de recuperación embrionaria en caprinos (basados en cirugía), con lo cual puede repetirse mayor cantidad de veces en la vida reproductiva de hembras sobresalientes. Pero quizás más importante es el hecho de que la plataforma permite evitar las 3 causas más comunes de fracaso en la MOET, esto es 1) baja tasa de ovulación; 2) baja tasa de fertilización en los huevos recuperados; y 3) alta incidencia de regresión temprana de cuerpos lúteos (Cognie *et al.*, 2003; Baldassarre y Karatzas, 2004). En consecuencia, mientras es común que en programas de MOET haya alrededor de un 25% de hembras que no producen embriones transferibles por lavado uterino, es extremadamente raro que una donante no produzca al menos un embrión transferible por sesión de AOL-PEIV. Otra ventaja adicional de esta plataforma radica en el hecho de que parece estar menos influenciada que la MOET por factores de estacionalidad reproductiva, al menos en lo que refiere a la respuesta folicular y cantidad de ovocitos recuperados en las 4 estaciones del año (Pierson *et al.*, 2005).

Usando los protocolos de referencia, en los últimos 8 años nuestro grupo ha realizado más de 2000 procedimientos de AOL resultando en un promedio de 14 ovocitos recuperados/donante. El promedio de recuperación (ovocitos recuperados/folículos aspirados) estuvo en el orden del 80%. La tasa promedio de embriones transferibles/donante luego de AOL-PEIV estuvo en el orden de 8 embriones y la tasa de preñez post-transferencia en el orden del 50-80%.

Propagación de hembras prepúberes

Esta aplicación representa sin duda la utilización más espectacular de la plataforma AOL-PEIV y la que podría considerarse que está siendo subutilizada en función de las ventajas que ofrece. La alta eficiencia de esta aplicación radica en 2 razones principales: 1) la MOET no puede ser utilizada con éxito en animales prepúberes (no hay competencia); 2) por razones que no son del todo comprendidas, la respuesta folicular de las cabras prepúberes es significativamente superior a la de los animales adultos (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de AOL en cabras prepúberes (3-5 meses) y adultas (> 1 año).

Edad	n	Folículos	Ovocitos	% Recuperación
Prepúberes	23	39±4.5 ^a	28.4±3.5 ^a	73% ^a
Adultos	21	19±1.4 ^b	15.9±1.5 ^b	84% ^a

Valores en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (ANOVA, P<0.01)

Fuente: Koeman *et al.*, 2003.

Estudios posteriores demostraron que la tasa de ovulación es aún mayor en animales prepúberes de menos de 3 meses de edad (Tabla 2), lo que sugiere que las mayores ventajas del sistema se podrían obtener trabajando con animales de dicha edad (Baldassarre *et al.*, 2002).

Tabla 2. Resultados de AOL en cabras prepúberes de dos edades diferentes.

Rango de Edad	n	Edad promedio	Folículos	Ovocitos	% Recuperación
60-90 días	20	74±7 días	59.3±28 ^a	49.7±24 ^a	84%
90-150 días	36	116±15 días	34.4±20 ^b	27.4±14 ^b	80%

Valores en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (ANOVA, P<0.001)

Fuente: Baldassarre *et al.*, 2002.

Con respecto a la tasa de desarrollo obtenida durante la PEIV y TE, nuestros resultados fueron semejantes a los reportados por otros autores trabajando con corderos (Armstrong *et al.*, 1997; Ptak *et al.*, 1999), demostrando que tasas aceptables de desarrollo hasta término pueden ser obtenidas con embriones *in vitro*

producidos a partir de ovocitos recuperados de cabras prepúberes (Tabla 3). En este trabajo (Baldassarre *et al.*, 2004b), las tasa de fertilización y de preñez obtenidas en animales prepúberes de mas de 3 meses de edad fueron significativamente mayores, logrando un cierto efecto de compensación respecto de la mayor cantidad de ovocitos recuperados en animales menores.

Tabla 3. Resultados de AOL-PEIV-ET en cabras prepúberes de dos edades diferentes.

Parámetro /Edad	<100 días	>180 días	P value
Numero de donantes	5	5	n/a
Folículos Aspirados	57.0±16	28.0±5	< 0.05
Ovocitos recuperados	41.0±9	25.8±6	< 0.05
Embriones transferidos	139	105	n/a
Embriones transferidos/Ovocitos recuperados (%)	67.8%	81.4%	< 0.01
Receptoras transferidas	23	15	n/a
Receptoras Preñadas (%)	9 (40%)	12 (80%)	< 0.05
Cabritos nacidos (% de embriones transferidos)	15 (1.9)	27 (2.2)	< 0.05

Fuente: Baldassarre *et al.*, 2004b.

La posibilidad de multiplicar exponencialmente hembras prepúberes de genética sobresaliente o inexistente en la región, con el valor agregado de acelerar la velocidad de progreso genético al disminuir el intervalo generacional, hacen que esta aplicación de la tecnología sea verdaderamente promisoría.

Propagación de hembras genéticamente superiores de edad avanzada

Es un hallazgo frecuente entre quienes trabajamos en el marco de la reproducción asistida en caprinos, que al cabo de varios años de alta productividad algunas hembras pueden volverse “difíciles de preñar”. Nos referimos a hembras múltiparas que al cabo de mas de 7 años de edad son inseminadas una y otra vez con técnicas y semen de probada calidad y no logran concebir. La mayor parte de las veces no hay un diagnóstico concreto y la lista de múltiples causas puede ser larga, pero el común denominador es que si intentamos producir prole de estos animales a partir del uso de la MOET, los resultados suelen ser catastróficos. En circunstancias similares, trabajando con bovinos de edad avanzada y/o malos antecedentes reproductivos (“vacas problema”), otros autores han descrito el uso exitoso de la PEIV-ET a partir de ovocitos inmaduros recuperados por punción guiada por ecografía (Looney *et al.*, 1994; Hasler *et al.*, 1995).

Con el mismo concepto en mente, realizamos un estudio en el que utilizamos como donantes de ovocitos cabras de mas de 7 años con antecedentes de haber fallado en concebir luego de 4 servicios por inseminación artificial (Baldassarre *et al.*, 2007). Los resultados fueron particularmente efectivos tanto en materia de ovocitos recuperados por donante, como en cuanto a las tasas de desarrollo *in vitro*, preñez y cabritos nacidos (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la aplicación práctica de la AOL-PEIV-ET en la propagación de cabras de mas de 7 años con problemas aparentes de fertilidad adquiridos

Parámetro	Total	Media (± d.s.)/donante
Folículos Aspirados	772	17.9±8
Ovocitos recuperados (% recuperación)	676 (87.5%)	15.7±8
Embriones clivados	487 (72%)	11.3±3.1
Embriones transferidos	296	n/a
Receptoras transferidas	50	n/a
Receptoras Preñadas (% de transferidas)	40 (80%)	n/a
Cabritos nacidos (% de embriones transferidos)	86 (30%)	3.4

Fuente: Baldassarre *et al.*, 2007.

Producción de cigotos en estadio de pronúcleos para microinyección de DNA

Esta aplicación puede ser considerada de aprovechamiento restringido por cuanto existen pocos grupos en el mundo trabajando en la producción de cabras transgénicas. Sin embargo, se trata de una aplicación ciertamente beneficiosa por lo cual merece ser mencionada. La producción de animales transgénicos mediante microinyección de DNA es menos eficiente que la basada en el uso de la transferencia nuclear a partir de células transfectadas *in vitro* (Baldassarre *et al.*, 2004a). Sin embargo, se trata de una técnica confiable, predecible y ofrece la ventaja de no requerir el pago de regalías por el uso de patentes, de modo que sigue siendo de interés.

Tradicionalmente, los cigotos para microinyección son obtenidos por lavaje de oviducto en hembras superovuladas e inseminadas. En este sentido, muchas de las desventajas de la técnica tradicional son comunes a las discutidas para la MOET: variabilidad en la respuesta superovulatoria, variabilidad en la tasa de fertilización de los huevos recuperados, limitaciones asociadas a la naturaleza quirúrgica del procedimiento. A las desventajas antedichas se agrega otra que es propia de la técnica: la incapacidad de controlar con exactitud el estadio de desarrollo de los cigotos recuperados al momento del lavaje de oviducto. Esto es muy importante en esta aplicación ya que está debidamente demostrado que la tasa de incorporación del DNA exógeno es mayor en cigotos en fase S del ciclo celular (~15-20h post fertilización). Contrariamente a lo que ocurre en los sistemas tradicionales, en el caso de producir los cigotos por medio de AOL-PEIV, la microinyección puede realizar al número exacto de horas post-fertilización deseado. Más aún, nuestros resultados indican que no hay ineficiencias asociadas a la naturaleza *in vitro* de los cigotos cuando comparamos los resultados de los trabajos con cigotos producidos *in vivo* vs. *in vitro* (Baldassarre *et al.*, 2004a).

Conclusiones

La AOL seguida de PEIV y TE ha avanzado significativamente en la última década. Actualmente, esta plataforma de producción de embriones ofrece numerosas ventajas para la multiplicación exponencial de hembras de genética sobresaliente, incluyendo la propagación de nuevos genotipos o razas ausentes o escasas en la región de interés. Por encima de todas las aplicaciones posibles, se destaca el uso para la propagación exponencial de animales prepúberes de alto valor. Esta es una aplicación que está subutilizada respecto de su enorme potencial, y creemos que tiene un enorme potencial de desarrollo, especialmente en planes de mejoramiento de ganado criollo a partir de la incorporación de genética superior, así como también en la incorporación de razas nuevas procedentes de otras regiones del mundo. En ambos casos, la diseminación de la nueva genética en la nueva región se vería acelerada al punto de tener progenie nacida alrededor del mismo tiempo que las donantes alcancen la edad de ser servidas por primera vez. Nuestros recientes trabajos usando animales de edad avanzada que perdieron su fertilidad abren un nuevo frente de aprovechamiento de la técnica, especialmente para prolongar la vida reproductiva de animales de alto valor genético. En la medida en que mayor número de profesionales aprendan las bases de la técnica de AOL y dispongan de laboratorios ofreciendo servicios de PEIV, existe una posibilidad concreta de ver más y más programas de mejoramiento en los que la plataforma *in vitro* reemplaza a la impredecible MOET. Finalmente, no hay dudas de que la AOL continuará siendo la técnica más eficiente para el abastecimiento de ovocitos para uso en biotecnologías reproductivas avanzadas (transgenesis y clonación).

Referencias

- Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR.** Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev*, v.9, p.333-339, 1997.
- Baldassarre H, De Matos DG, Furnus CC, Castro TE, Cabrera Fischer EI.** Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim Reprod Sci*, v.35, p.145-150, 1994.
- Baldassarre H, Furnus CC, De Matos DG, Pessi H.** *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, v.45, p.707-717, 1996.
- Baldassarre H, Karatzas CN.** Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.255-266, 2004.
- Baldassarre H, Rao KM, Neveu N, Brochu E, Begin I, Behboodi E, Hockley DK.** Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reprod Fertil Dev*, 2007. No prelo.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN.** Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v.59, p.831-839, 2003.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas CN.** Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, v.57, p.275-284, 2002.
- Baldassarre H, Wang B, Keefer CL, Lazaris A, Karatzas CN.** State of the art in the production of transgenic goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.465-470, 2004a.
- Baldassarre H, Wang B, Pierson J, Neveu N, Sneek L, Lapointe J, Cote F, Kafidi N, Keefer CL, Lazaris A, Karatzas CN.** Prepubertal propagation of transgenic cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.25-29, 2004b.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59, 171-88, 2003.



- Cognie Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P.** State-of-the-art production, conservation and transfer of *in vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, V.16, p.437-445, 2004.
- Cox J, Alfaro V.** *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod Dom Anim*, v.42, p.83-87, 2007.
- Evans G, Maxwell WM.** *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney: Butterworths, 1987.
- Graff KJ, Meintjes M, Dyer VW, Paul JB, Denniston, RS, Ziomek C, Godke RA.** Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology*, v.51, p.1099-1119, 1999.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE.** Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- Katska-Ksiazkiewicz, L., Rynska, B., Gajda, B., and Smorag, Z.** Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of *in vitro* embryo production in goats. *Theriogenology*, v.62, p.576-586, 2004.
- Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H, Downey BR.** Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*, v.60, p.879-889, 2003.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL.** Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v.41, p.67-72, 1994.
- McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ.** Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture *in vitro*: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb)*, v.3, p.238-246, 2000.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL.** Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.
- Perez LJ, Valcarcel A, de Las Heras MA, Moses DF, Baldassarre H.** *In vitro* capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, v.45, p.1037-1046, 1996.
- Pierson J, Wang B, Neveu N, Sneek L, Cote F, Karatzas CN, Baldassarre H.** Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.795-799, 2005.
- Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P.** Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod*, v.61, p.1568-1574, 1999.
- Snyder DA, Dukelow WR.** Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnosis, and follicle aspiration in sheep. *Theriogenology*, v.2, p.143-18, 1974.
- Stangl M, Kuhholzer B, Besenfelder U, Brem G.** Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, v.52, p.709-716, 1999.
- Tervit HR.** Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.227-238, 1996.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE.** Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, v.30, p.493-497, 1972.
- Wang B, Baldassarre H, Tao T, Gauthier M, Neveu N, Zhou JF, Leduc M, Duguay F, Bilodeau AS, Lazaris A, Keefer C, Karatzas CN.** Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes. *Mol Reprod Dev*, v.63, p.437-443, 2002.
- Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MA, Brackett BG.** *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod*, v.44, p.1177-1182, 1991.
-