



Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación¹

Assisted reproduction in goats: artificial insemination to cloning

Hernán Baldassarre

Pharmathene Canada Inc., 320 St. Georges, St. Telesphore, Quebec J0P 1Y0, Canada

Correspondencia: hbaldassarre@pharmathene.ca

Resumen

Todas las técnicas de reproducción asistida han sido desarrolladas/adaptadas a la especie caprina. Sin embargo, por cuestiones de costo y eficiencia, solo unas pocas han sido implementadas en gran escala en planes de mejoramiento genético. Los métodos más utilizados son la sincronización de celo y la inseminación artificial, los cuales han permitido la introducción masiva de genética superior y han provisto los medios para superar las trabas de la estacionalidad reproductiva. La transferencia embrionaria ha cumplido un rol importante en programas de intercambio genético, incluyendo la incorporación de razas exóticas, pero su difusión continúa limitada debido a su alto costo y alta variabilidad de sus resultados. La producción de embriones *in vitro* a partir de ovocitos recuperados por laparoscopia ha abierto un nuevo frente, con posibilidades de mejorar la eficiencia de la MOET a partir de su mayor consistencia y aplicabilidad a categorías especiales. Por último la producción de animales transgénicos y clonados se encuentra de momento limitada a la producción de proteínas recombinantes de uso farmacológico. Su potencial para acelerar el mejoramiento genético ha sido establecido, pero seguramente no será aplicado hasta que no se logre bajar los costos, mejorar la eficiencia y convencer a gobernantes y público consumidor que no existen problemas de seguridad asociados con el consumo de productos alimentarios derivados de estos animales y sus progenies.

Palabras clave: inseminación, transferencia embrionaria, transgénesis, clonación

Abstract

*All assisted reproduction technologies have been developed and/or adapted to goats. However, for reasons of cost and efficiency, very few have been implemented in scale in genetic improvement programs. Estrus synchronization and artificial insemination are the most utilized technologies, and have allowed widespread introduction of superior genetics along with overcoming the limitations from reproductive seasonality. Embryo transfer has played an important role allowing genetic exchange programs, including the incorporation of exotic breeds, but utilization has been somewhat limited for reasons of high cost and variability of results. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production has open a new front with good possibilities of improving results obtained by standard MOET, based on its higher consistency and applicability to special categories of animals. The production of transgenic and cloned goats has been limited to the production of genetically engineered animals expressing recombinant proteins of pharmaceutical interest in the milk. The potential for these technologies to accelerate genetic improvement has been established, however, before they can be applied in livestock improvement programs they need to become more cost efficient, and demonstrate safety for consumers in front of regulatory agencies and general public.*

Keywords: Artificial insemination, MOET, transgenic, cloning

Introducción

El uso de tecnologías de reproducción asistida permite acelerar la velocidad de progreso genético principalmente a través del incremento del diferencial de selección (inseminación artificial, transferencia embrionaria), pero también a través del acortamiento del intervalo generacional (*in vitro* producción de embriones a partir de ovocitos de animales prepúberes) y a través de la alteración del genoma animal usando tecnologías de última generación (transgénesis-clonación). Asimismo, la combinación de algunas de estas técnicas con la sincronización hormonal del estro son fundamentales para poder generar progenie y producto (leche, carne) durante todo el año en especies de reproducción estacional como las cabras.

Todas las técnicas de reproducción asistida han sido desarrolladas y/o adaptadas a la especie caprina. Sin embargo, por cuestiones de costo y eficiencia, solo unas pocas han sido implementadas en gran escala en planes de mejoramiento genético. El presente manuscrito es una revisión del “estado del arte” para cada una de estas técnicas, junto con una perspectiva respecto del futuro de su implementación en caprinocultura. Queda excluida de este manuscrito la producción de embriones *in vitro* ya que la misma es detallada en un segundo

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR

manuscrito del mismo autor que será publicado en estos mismos Anales del Congreso del Colegio Brasileiro de Reproducción Animal, Curitiba, 2007.

Tecnologías reproductivas

Sincronización hormonal de celo y ovulación

La sincronización de celo constituye un paso absolutamente primordial para el éxito en todas las tecnologías de reproducción asistida. Por un lado, la técnica permite calendarización de las distintas actividades asociadas al programa reproductivo (ej. inseminación a tiempo fijo). Por otro lado, es esencial para sincronizar el estadio de desarrollo embrionario con el día de ciclo en el útero receptor, en programas que involucran transferencia embrionaria. Por último, en especies de reproducción estacional como la caprina, es fundamental para permitir la realización de trabajos reproductivos año corrido.

El método más difundido de sincronización de celo (y probablemente el más efectivo) es el basado en el uso de dispositivos a base de progestágenos. Dependiendo de factores de disponibilidad en cada mercado, estos dispositivos pueden tener la forma de esponjas intravaginales impregnadas en progestágeno (acetato de medroxiprogesterona, acetato de fluorogestona); dispositivos intravaginales de liberación controlada "CIDR" impregnados en progesterona; o implantes subcutáneos de silicona impregnados en el progestágeno norgestomet (Evans y Maxwell, 1987; Freitas *et al.*, 1997; Chemineau *et al.*, 1999). Cualquiera de los 3 tipos, el protocolo básico consiste en implantar el dispositivo por espacio de 9-11 días en combinación con una inyección luteolítica de prostaglandina (o análogo) en algún punto entre 0 y 48 horas antes de retirar el dispositivo, lo que permite asegurar que el animal no presente un cuerpo lúteo activo luego de retirada la esponja. El uso de "protocolos largos", en los cuales los dispositivos son dejados espacio de 18-21 días, ha sido descrito en el pasado. Estos protocolos no requieren ser combinados con un luteolítico por lo que hay un pequeño ahorro en el costo de sincronización, pero su utilización ha sido asociada con fertilidad reducida como consecuencia de un impacto negativo en la capacidad de transporte seminal dentro del tracto reproductor femenino.

Tanto para el caso de la IA como para el caso de la sincronización de receptoras de embriones, la sincronización del desarrollo folicular y la ovulación es mayor si se administra 250-500 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) alrededor del momento de retiro de dispositivos de sincronización. En el caso de las receptoras esto nos permite tener mayor consistencia en la sincronización; el en caso de de la IA es esencial para poder optimizar los resultados de preñez usando inseminación a tiempo fijo. La eCG debe ser utilizada con mucho cuidado en el caso de IA para evitar efectos indeseados (superovulación). La dosis debe ser calculada teniendo en cuenta múltiples factores incluyendo raza, edad, peso, usos anteriores, interés en partos múltiples, información de la respuesta en temporadas anteriores. También se debe tener presente que la efectividad de la respuesta puede disminuir a través de los años como consecuencia del desarrollo de anticuerpos anti-eCG (Roy *et al.*, 1999; Drion *et al.*, 2001). La sincronización de la ocurrencia de la ovulación puede ser mejorada a través de la administración de GnRH alrededor del momento del celo, lo cual es valioso en programas de inseminación a tiempo fijo, así como también para tener mayor control respecto del estadio de desarrollo de ovocitos y embriones recuperados (Pierson *et al.*, 2003).

Por cuestiones de costo, marco regulatorio o preferencia del mercado, existen situaciones en las que la sincronización hormonal de celo no puede ser utilizada. En estos casos, estrategias alternativas han sido utilizadas con diversos niveles de éxito para permitir la expansión de la temporada reproductiva. Dichas estrategias incluyen el "efecto macho", el uso de fotoperíodos artificiales y la administración de melatonina (Chemineau *et al.*, 1988; du Preez *et al.*, 2001; Delgadillo *et al.*, 2004; Martin y Kadokawa, 2006). Si bien estas técnicas son efectivas para anticipar la salida del anestro estacional o la producción de preñeces fuera de la temporada reproductiva, su valor es extremadamente limitado como soporte de programas que requieren calendarización precisa y sincronización de ovulación ajustada.

Inseminación Artificial (IA)

La primera de las tecnologías de reproducción asistida continúa siendo la que mayor contribución ha hecho al mejoramiento genético y la más utilizada en todo el mundo (Nicholas, 1996). El éxito de la inseminación se debe a su relativa simplicidad y su capacidad de producir cambios significativos en la productividad de la progenie cuando se utilizan machos debidamente seleccionados a partir de test de progenie (Evans and Maxwell, 1987; Chemineau y Cognie, 1991; Leboeuf *et al.*, 2000).

La inseminación con semen fresco y/o refrigerado es la técnica de elección cuando los machos se encuentran en el establecimiento o en un radio cercano (cooperativas de productores de la región compartiendo el uso de reproductores). En estos casos, la inseminación vaginal (fresco) o intracervical (refrigerado) sobre celo natural o sincronizado, permiten obtener altas tasas de gestación (>60%) y no requieren equipamiento costoso o entrenamiento sofisticado.

El congelamiento de semen permite una serie de ventajas adicionales, entre las que se destacan la posibilidad de usar el semen fuera de la estación reproductiva, la extensión de la vida reproductiva de machos sobresalientes más allá de su vida y la posibilidad de comercialización de semen (nacional e internacional). Sin embargo, el uso de semen congelado en caprinos tiene algunos obstáculos respecto de otras especies mayores como los bovinos. En primer lugar está el hecho de que el plasma seminal caprino contiene una lipasa producida por las glándulas bulbouretrales, que interactúa con la leche y/o yema de huevo produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide (Leboeuf *et al.*, 2000). A los efectos de evitar daño espermático, al menos 2 estrategias han sido utilizadas con éxito: la centrifugación del eyaculado para eliminar el plasma seminal previo al uso de diluyentes convencionales (20% yema de huevo); el uso de diluyente con bajo porcentaje de yema (2%) aunque estos diluyentes pueden resultar en insuficiente protección de membranas durante la refrigeración (Evans and Maxwell, 1987; Chemineau y Cognie, 1991; Leboeuf *et al.*, 2000). Mas recientemente nuestro grupo ha utilizado con éxito la última generación en diluyentes para congelamiento de semen, esto es diluyentes sin componentes biológicos. Estos diluyentes han sido desarrollados en forma primaria para la especie bovina, y con la intención de disminuir los riesgos sanitarios atribuibles al uso de biológicos (Hinsch, 1997; Gil *et al.*, 2003). Si bien en nuestros programas no lo estamos usando para inseminación artificial, semen caprino congelado con Bioexcel® (IMV, Francia) ha resultado en excelentes tasas de motilidad post-descongelado, fertilización *in vitro* y preñez post-transferencia (Baldassarre *et al.*, 2007).

El uso de semen sexado en la especie caprina continúa siendo una asignatura pendiente respecto de otras especies donde se encuentra avanzado, incluyendo bovinos (Seidel Jr. *et al.*, 1999), ovinos (de Graaf *et al.*, 2007), equinos (Buchanan *et al.*, 2000) y porcinos (Rath *et al.*, 2003). Ningún trabajo ha sido publicado todavía y debemos suponer que la demora en este desarrollo obedece principalmente a una cuestión de alto costo del equipamiento necesario en combinación con la falta de interés comercial, ya que la técnica debería ser perfectamente viable en base a la diferencia en la masa de DNA entre los cromosomas X e Y en cabras.

Superovulación y transferencia embrionaria

Esta tecnología es mas comúnmente referida con su sigla derivada del inglés, MOET, y es a la hembra lo que la inseminación artificial es al macho, es decir, un sistema para producir mayor cantidad de hijos de una hembra sobresaliente. Si bien su valor desde este punto de vista está claro, se trata de una técnica que no se ha desarrollado en la especie caprina a la misma velocidad que en otras especies, principalmente como consecuencia de sus inconsistencias en materia de resultados, su alto costo y la naturaleza quirúrgica de los procedimientos para recolección y transferencia de embriones (Baril, 1993; Cognie *et al.*, 2003; Baldassarre y Karatzas, 2004).

Se trata posiblemente de la técnica de reproducción asistida mas frustrante para el profesional, ya que uno varía entre el mayor suceso y el peor fracaso sin cambiar absolutamente nada en los protocolos operativos. Los factores principales que determinan esa enorme inconsistencia son la variabilidad en la respuesta al tratamiento superovulatorio, la recuperación de huevos sin fertilizar y la incidencia de regresión temprana de cuerpos lúteos. Si bien se puede decir que los programas de MOET caprina resultan en un promedio de 6 a 8 embriones transferibles/donante (Baril, 1993; Cognie *et al.*, 2003; Baldassarre y Karatzas, 2004), también es cierto que la variabilidad está en el rango de los 0 a 30 embriones transferibles/donante y que no es raro encontrar que un 25-50% de las donantes no produzcan ningún embrión transferible. Claramente, estos hallazgos no contribuyen a la difusión de la tecnología en el ámbito de la producción caprina.

Gran parte de la variabilidad en la respuesta ovulatoria se atribuye a la población folicular presente en los ovarios al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, la cual es completamente aleatoria en los protocolos convencionales (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2004). Diversas estrategias han sido diseñadas y testeadas a los efectos de aumentar en número de folículos reclutables y disminuir los efectos negativos de folículos dominantes al comienzo del estímulo gonadotrópico. Entre las estrategias utilizadas se destacan: 1) El uso de agonistas y/o antagonistas de GnRH previo a la superovulación a los efectos de incrementar el número de folículos pequeños disponibles para estimulación con FSH exógena (Cognie *et al.*, 2003); 2) iniciar el tratamiento superovulatorio al comienzo del ciclo, inmediatamente después de la ovulación (Menchaca *et al.*, 2002); 3) asegurar concentraciones de progesterona alta durante la fase inicial del tratamiento superovulatorio (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2004).

Con respecto a la baja tasa de fertilización en los huevos recuperados, la misma ha sido atribuida en parte a una disminución en la capacidad de transporte espermático en el tracto de cabras superovuladas (Evans y Armstrong, 1984), la cual puede mejorarse efectivamente mediante el uso de inseminación intrauterina, especialmente la IA laparoscópica que permite el depósito del semen en el tercio tubárico de ambos cuernos uterinos (Armstrong y Evans, 1984). Otra causa de pobre fertilización es la falta de sincronización entre el momento de inseminación y el momento de ovulación, la cual puede mejorarse notablemente mediante el uso de GnRH o LH alrededor del momento del celo detectado (Pierson *et al.*, 2003).

La incidencia de la regresión temprana de cuerpos lúteos (RTCL) puede llegar al 30% de las donantes

en el programa (Pintado *et al.*, 1998). Se trata de una entidad verdaderamente frustrante ya que se observa a menudo en animales que tuvieron una respuesta muy favorable en términos de celo y número de ovulaciones. Si se utiliza laparoscopia exploratoria para determinar la respuesta ovulatoria previo a decidir si se efectúa el lavado uterino, los animales con RTCL no deberían ser lavados ya que en la mayoría de los casos no se recuperará ningún embrión viable. Las causas de la RTCL no son bien conocidas, pero su ocurrencia ha sido ligada a problemas de nutrición (Jabbour *et al.*, 1991), el uso de eCG en programas superovulatorios (alto estradiol producto de folículos persistentes) (Pintado *et al.*, 1998), y stress (Baldassarre y Karatzas, 2004). Distintas estrategias han sido utilizadas a los efectos de minimizar la incidencia de la RTCL incluyendo el uso de medicación anti-prostaglandina para prevenir la luteólisis (Battye *et al.*, 1988); evitar el uso de eCG en donantes; y la luteinización de folículos estrogénicos por medio de una inyección de GnRH/hCG a los 3 días después de la IA de donantes (Saharrea *et al.*, 1998). Sin embargo, la solución más interesante ha sido el uso de esponjas intravaginales a base de progestágenos para suplementar progesterona y así soportar el desarrollo embrionario en cabras donantes expuestas a RTCL (Espinosa-Marquez *et al.*, 2004; Cervantes *et al.*, 2007).

Si bien existen en la literatura trabajos de recuperación de embriones en cabras por lavado uterino transcervical (Pereira *et al.*, 1998), la mayoría de los grupos alrededor del mundo realiza la colecta y transferencia de embriones en forma quirúrgica (con o sin asistencia laparoscópica). En combinación con las limitaciones previamente descritas, la naturaleza quirúrgica de los procedimientos agrega riesgo operatorio y repetibilidad limitada a la lista de factores negativos para la utilización de esta tecnología en gran escala.

Producción de embriones in vitro a partir de ovocitos colectados por laparoscopia

Esta tecnología es descrita en extensión en un segundo manuscrito del mismo autor, como parte de estos mismos Anales del Congreso del Colegio Brasileiro de Reproducción Animal (Curitiba, 2007). A modo de síntesis, esta tecnología tiene, como la MOET, el objetivo de producir mayor cantidad de hijos a partir de hembras sobresaliente. Sin embargo tiene numerosas ventajas respecto de la MOET en términos de consistencia en los resultados y capacidad de ser aplicada en categorías que no pueden ser reproducidas vía MOET (ejemplo hembras prepuéres y seniles).

Transgenesis y Clonación

Por definición, un animal transgénico es aquel que ha incorporado en forma estable en su genoma un fragmento exógeno de DNA, de tal manera que lo transmite a su progenie en forma mendeliana. La tecnología tiene importantes aplicaciones al menos a tres niveles: 1) en investigación, para el estudio de los genes, su función y mecanismos de regulación, así como también el desarrollo de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas; 2) en ganadería, para acelerar la velocidad de progreso genético sea a través de la incorporación de nuevos genes o a través de la modificación de genes endógenos que regulan parámetros productivos de importancia económica; finalmente, 3) en biotecnología, para la producción de proteínas recombinantes de interés farmacológico o médico que no pueden ser producidas en forma eficiente en plataformas convencionales utilizando microorganismos y células en cultivo. En el caso especial de los caprinos, las aplicaciones ganaderas y biotecnológicas son las que merecen más atención.

El proceso de generar un rodeo transgénico tiene una etapa costosa, laboriosa e ineficiente (la producción de fundadores), la cual es seguida de una etapa de reproducción convencional para propagar las líneas seleccionadas usando métodos corrientes en ganadería (IA), y así generar lo que será el rodeo productor. Los detalles técnicos de cómo generar fundadores transgénicos han sido cubiertos en detalle en publicaciones previas de nuestro grupo (Wang *et al.*, 2002; Baldassarre *et al.*, 2002, 2003b, 2004). El cassette de DNA a utilizar está normalmente integrado por la secuencia que codifica la producción de la proteína de interés, ligada a la secuencia reguladora (promotor) de una proteína sintetizada naturalmente en el tejido blanco. Por ejemplo, en nuestro caso habitualmente producimos proteínas recombinantes de origen humano en la leche de nuestras cabras transgénicas, para lo cual utilizamos el promotor de la β -caseína caprina a los efectos de que la proteína de interés se produzca en la glándula mamaria. A los efectos de incorporar el DNA exógeno dentro del genoma del animal, básicamente existen 2 métodos que han sido utilizados extensivamente en cabras: la microinyección de pronúcleos y la transfección de células en cultivo seguida de su uso para transferencia nuclear. La microinyección de pronúcleos se realiza idealmente en cigotos entre las 15-20 horas después de la fertilización (Wang *et al.*, 2002). La Tabla 1 resume los resultados obtenidos en la producción de fundadores transgénicos por microinyección de pronúcleos utilizando cigotos producidos in vivo (recuperados por lavado de oviducto) o in vitro (a partir de ovocitos inmaduros recuperados por laparoscopia).

Tabla 1. Resultados comparativos en la producción de fundadores transgénicos por microinyección de pronúcleos utilizando cigotos producidos *in vivo* vs. *in vitro*.

Tipo de cigotos	In vivo	In Vitro
Cigotos microinyectados y transferidos	706	2001
Receptoras transferidas	186	311
Receptoras preñadas	100 (54%)	157 (50%)
Crías nacidas	115	211
Crías transgénicas (% de las nacidas)	5 (4%)	15 (7%)
Crías transgénicas (% de los cigotos inyectados)	0.7%	0.7%

 Fuente: Baldassarre *et al.*, 2004.

Como regla general, se puede decir que este método es confiable y casi siempre resulta en la producción de fundadores transgénicos. Sin embargo es muy ineficiente (<10% de las crías nacidas son transgénicas), la integración del gen dentro del genoma del animal es completamente al azar (número de copias del transgen; número de eventos de integración; sitio de la integración). Estas variables son muy importantes ya que ha sido ampliamente demostrado que la cantidad de proteína recombinante producida depende del número de copias del transgene (Echelard *et al.*, 2002; Bodrogi *et al.*, 2006) y el nivel de actividad de transcripción en el sitio de integración (Prunkard *et al.*, 1996). Más recientemente, la disponibilidad de la técnica de transferencia nuclear a partir de células somáticas (clonación), ha permitido aumentar notablemente la eficiencia en la producción de fundadores transgénicos. Células recuperadas de a partir de fetos de 25-30 días (fibroblastos) son normalmente preferidas para transfección. En este caso el cassette de DNA incluye, además del gen de interés y el promotor, un gen marcador que permitirá seleccionar las células que han incorporado el DNA en su genoma, el cual puede ser un indicador visual como la “proteína fluorescente verde” o bien un gen que confiere resistencia a la neomicina. El DNA es internalizado mediante lípidos (lipofección) y las células son caracterizadas post-selección usando southern blot y FISH (fluorescent in situ hybridization) para determinar el número de copias del transgen, número de sitios de integración y posición en el cromosoma. La técnica de clonación es muy ineficiente desde un punto de vista reproductivo (Tabla 2), pero debido a que permite caracterizar las células antes de usarlas en la generación de los animales y al hecho de que todos los animales nacidos serán transgénicos y del sexo de interés, hacen que esta técnica sea muy superior a la microinyección de pronúcleos en la producción de fundadores transgénicos.

 Tabla 2. Eficiencia de las diferentes etapas en la producción de fundadores transgénicos a partir de células transfectadas *in vitro*, usando transferencia nuclear.

	Células <i>in vitro</i> transfectadas	
Nro. de líneas celulares	37	
Ovocitos procesados	7516	12.4/donante
Embriones transferidos	3528	
Receptoras transferidas	313	11.2/receptora
Preñez inicial	110	34%
Pérdidas tempranas (<60d)	36	33%
Pérdidas tardías (>60d)	7	6%
Preñeces a término	67	21%
Total cabritos nacidos	111	1.7/receptora
Total cabritos vivos	96	86%
Total transgénicos vivos	84	87%

 Fuente: Baldassarre *et al.*, 2004.

En el campo de la ganadería, existen diversos ejemplos en los que la tecnología de transgenesis ha sido utilizada con éxito. Para el caso de genes “agregados” podemos citar el ejemplo de las vacas resistentes a la mastitis por *Staphylococcus Aureus* a través de la expresión en leche de lisostafina (Wall *et al.*, 2005); y el caso de cabras expresando estearil-CoA en la leche lo que resulta en una composición lipídica mas saludable para consumo humano, por disminución del contenido de ácidos grasos saturados. Con respecto al uso de la transgenesis para modificar la expresión de genes endógenos de importancia económica, podemos citar el caso de vacas sobre-expresando los genes de producción de caseínas lo que resulta en un mayor rendimiento en la producción de quesos (Brophy *et al.*, 2003); y cerdas sobre-expresando el gen de la α -lactalbúmina lo que resultó en una mayor producción de lactosa, mayor producción de leche y mayor velocidad de crecimiento en los

lechones lactantes (Noble *et al.*, 2002).

La aplicación más desarrollada en el campo de la transgénesis aplicada a cabras es la producción de proteínas recombinantes de interés farmacéutico y médico. En este particular se destaca la producción de antitrombina III (Zhou *et al.*, 2005), que ha sido recientemente autorizada para comercialización en Europa, convirtiéndose en el primer medicamento producido en animales transgénicos en alcanzar este nivel de avance en el desarrollo comercial. Otras proteínas recombinantes cuya producción en la leche de cabras transgénicas ha sido reportada incluyen: activador tisular de plasminógeno humano (Ebert *et al.*, 1991); antígenos para vacunación contra malaria (Behboodi *et al.*, 2005); α -fetoproteína humana (Parker *et al.*, 2004), proteína de tela de araña (Karatzas *et al.*, 1999); butiril-colinesterasa humana (Cerasoli *et al.*, 2005) y anticuerpos monoclonales (Young *et al.*, 1998; Pollock *et al.*, 1999).

Con respecto a la clonación con fines reproductivos, es decir la producción de copias idénticas de individuos de alto valor genético, la misma ha sido descrita también con anterioridad por nuestro grupo (Keefer *et al.*, 2002; Baldassarre *et al.*, 2003a). La Tabla 3 resume la eficiencia de las diferentes etapas y los resultados obtenidos.

Tabla 3. Eficiencia de las diferentes etapas en la clonación de individuos de alto valor usando transferencia nuclear a partir de células somáticas.

	Clonación de animales vivos	
Nro. de líneas celulares	20	
Ovocitos procesados	6377	13.7/donante
Embriones transferidos	3082	
Receptoras transferidas	279	10.7/receptora
Preñez inicial	102	34%
Pérdidas tempranas (<60d)	21	20%
Pérdidas tardías (>60d)	4	4%
Preñeces a término	77	24%
Total cabritos nacidos	108	1.4/receptora
Total cabritos vivos	78	72%
Total transgénicos vivos	66	85%

Fuente: Baldassarre *et al.*, 2004.

El uso de la clonación caprina con fines reproductivos está prácticamente restringido a la clonación de animales transgénicos de alto valor. Debido al alto costo y la ineficiencia general de la tecnología, es impensable que esta técnica vaya a ganar adeptos a nivel de programas de mejoramiento ganadero en capricultura, principalmente debido al bajo valor relativo de los animales comparado con otras especies (bovinos, equinos). Además, existen de momento muchas dudas con respecto a la seguridad para el consumo humano de productos alimentarios originados de animales clonados y sus progenies. Si bien el grupo científico liderado por la Academia de Ciencias de los Estados Unidos no encontró diferencias en la composición de carnes y leche procedente de clones y sus progenies (Tian *et al.*, 2005), la última palabra todavía no ha sido dada. Todo parece indicar que el *Food and Drug Administration (FDA)* liberará para consumo los productos cárneos y lácteos procedentes de animales clonados, pero existen todavía muchos grupos de oposición presionando políticamente para frenar la autorización de mercado.

Conclusiones

Múltiples tecnologías de reproducción asistida se encuentran completamente desarrolladas y aptas para uso en producción caprina. De todas ellas, la sincronización hormonal de celos y la inseminación artificial son las 2 más difundidas en todo el mundo y las que tienen mayor impacto económico para el productor. La aplicación en escala comercial de la MOET tiene dificultades de consistencia en los resultados, razón por la cual su uso se ve limitado principalmente a programas de generación de embriones para exportación/importación. La producción de embriones *in vitro* a partir de ovocitos recuperados por laparoscopia parece tener una mayor consistencia y amplitud de aplicaciones, por lo que podría reemplazar en parte a la MOET en este tipo de programas. Finalmente, la transgénesis y la clonación caprina han sido completamente desarrolladas por la industria de producción de proteínas recombinantes de interés biotecnológico, donde la cabra representa un modelo animal muy interesante debido a su alta eficiencia en la producción lechera. Sin embargo, las eficiencias deberán aumentar, los costos disminuir y la percepción gubernamental y pública mejorar antes de que la transgénesis y la clonación puedan ser aplicadas en ganadería.

Referencias

- Armstrong DT, Evans G.** Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *J Reprod Fertil*, v.71, p.89-94, 1984.
- Baldassarre H, Karatzas CN.** Advanced assisted reproduction technologies ART in goats. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.255-266, 2004.
- Baldassarre H, Keefer C, Wang B, Lazaris A, Karatzas CN.** Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.279-285, 2003a.
- 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, 2003b.
- 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.275-84, 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, 2004.
- Baril GBPCP.** *Manuel de formation pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chevre*. Rome: FAO, 1993.
- Battye KM, Fairclough RJ, Cameron AW, Trounson AO.** Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat *Capra hircus*. *J Reprod Fertil*, v.84, p.425-430, 1988.
- Behboodi E, Ayres SL, Memili E, O'Coin M, Chen LH, Reggio BC, Landry AM, Gavin WG, Meade HM, Godke RA, Echelard Y.** Health and reproductive profiles of malaria antigen-producing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, v.7, p.107-118, 2005.
- Bodrogi L, Brands R, Raaben W, Seinen W, Baranyi M, Fiechter D, Bosze Z** High level expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits *Transgenic Res*, v.15, p.627-636, 2006.
- Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G.** Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol*, v.21, p.157-162, 2003.
- Buchanan BR, Seidel GE Jr, McCue PM, Schenk JM, Herickhoff LA, Squires EL.** Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1333-1344, 2000.
- Cerasoli DM, Griffiths EM, Doctor BP, Saxena A, Fedorko JM, Greig NH, Yu QS, Huang Y, Wilgus H, Karatzas CN, Koplovitz I, Lenz DE.** In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase Protexia as a potential nerve agent bioscavenger. *Chem Biol Interact*, v.157/158, p.363-365, 2005.
- Cervantes MJ, Juarez ML, Mejia VO, Berruecos VJ, Vera AH, Valencia J.** Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Anim Reprod Sci*, v.97, p.47-54, 2007.
- Chemineau P, Baril G, Leboeuf B, Maurel MC, Roy F, Pellicer-Rubio M, Malpoux B, Cognie, Y.** Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *J Reprod Fertil Suppl*, v.54, p.129-142, 1999.
- Chemineau P, Cognie Y.** *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. Rome: FAO, 1991.
- Chemineau P, Pelletier J, Guerin Y, Colas G, Ravault JP, Toure, G, Almeida G, Thimonier J, Ortavant R.** Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod Nutr Dev*, v.28, p.409-422, 1988.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- de Graaf SP, Evans G, Maxwell WM, Cran DG, O'Brien JK.** 2007 Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, p.391-398.
- Delgadillo JA, Fitz-Rodríguez G, Duarte G, Veliz FG, Carrillo E, Flores JA, Vielma J, Hernandez H, Malpoux B.** Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.471-478, 2004.
- Drion PV, Furtoss V, Baril G, Manfredi E, Bouvier F, Pougard JL, Bernelas D, Caugnon P, McNamara EM, Remy B, Sulon J, Beckers JF, Bodin L, Lebeuf B.** Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction *Reprod Nutr Dev*, v.41, p.401-412, 2001.
- du Preez ER, Donkin EF, Boyazoglu PA, Rautenbach GH, Barry DM, Schoeman HS.** Out-of-season breeding of milk goats--the effect of light treatment, melatonin and breed. *J S Afr Vet Assoc*, v.72, p.228-231, 2001.



- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K.** Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, v.9, p.835-838, 1991.
- Echelard Y, Destremes MM, Koster JA, Blackwell C, Groen W, Pollock D, Williams JL, Behboodi E, Pommer J, Meade HM.** Production of recombinant human serum albumin in the milk of transgenic cows. *Theriogenology*, v.57, p.779, 2002. Resúmen.
- Espinosa-Marquez MC, Valencia J, Zarco L, Escobar-Medina FJ, Colina-Flores F, Rechiga-Flores CF.** Effect of fluorogestone acetate on embryo recovery and quality in eCG-superovulated goats with premature luteal regression. *Theriogenology*, v.62, p.624-630, 2004.
- Evans G, Armstrong DT.** Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J Reprod Fertil*, v.70, p.47-53, 1984.
- Evans G, Maxwell WM.** *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney, Australia: Butterworths, 1987.
- Freitas VJ, Baril G, Saumande J.** Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implants. *Anim Reprod Sci*, v.46, p.237-244, 1997.
- Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H.** Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.1157-1170, 2003.
- Gonzalez-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, Inskoop EK, Lopez-Sebastian A, McNeilly AS, Santiago-Moreno J, Souza CJ, Veiga-Lopez A.** Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.421-435, 2004.
- Hinsch E, Hinsch KD, Boehm JG, Schill WB, Mueller-Schloesser F.** Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg yolk free and egg yolk containing extenders. *Reprod Domest Anim*, v.32, p.143-149, 1997.
- Jabbour, HN, Ryan JP, Evans G, Maxwell, WM.** Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod Fertil Dev*, v.3, p.699-707, 1991.
- Karatzas CN, Zhou FJ, Huang Y, Duguay F, Chretien N, Bhatia B, Bilodeau AS, Keyston R, Tao T, Keefer CL, Wang B, Baldassarre H, Lazaris, A.** Production of recombinant spider silk BioSteel® in the milk of transgenic animals. *Transgenic Res*, v. 8, p.476-477, 1999.
- Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN.** Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod*, v.66, p.199-203, 2002.
- Leboeuf, B, Restall B, Salamon, S.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141, 2000.
- Martin, G B, and Kadokawa, H.** Clean, green and ethical" animal production Case study: reproductive efficiency in small ruminants. *J Reprod Dev*, v.52, p.145-152, 2006.
- Menchaca, A, Pinczak, A, and Rubianes, E** Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats *Theriogenology*, v.58, p.1713-1721, 2002, .
- Nicholas FW.** Genetic Improvements through reproductive technologies. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.205-214, 1996.
- Noble MS, Rodriguez-Zas S, Cook JB, Bleck GT, Hurley WL, Wheeler MB.** 2002 Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine alpha-lactalbumin in their milk. *J Anim Sci*, 80, 1090-1096.
- Parker MH, Birck-Wilson E, Allard G, Masiello N, Day M, Murphy KP, Paragas V, Silver S, Moody MD.** 2004 Purification and characterization of a recombinant version of human alpha-fetoprotein expressed in the milk of transgenic goats. *Protein Expr Purif*, v.38, p.177-183.
- Pereira RJ, Sohnrey B, Holtz W.** Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2alpha and oxytocin. *J Anim Sci*, v.76, p.360-363, 1998.
- Pierson, J T, Baldassarre, H, Keefer, C L, and Downey, B R.** Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. *Theriogenology*, v.60, p.397-406, 2003.
- Pintado B, Gutierrez-Adan A, Perez LB.** Superovulatory response of Murciana goats to treatments based on PMSG/Anti-PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology* 50, 357-364, 1998.
- Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM.** Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Meth*, v.231, p.147-157, 1999.
- Prunkard D, Cottingham I, Garner I, Bruce S, Dalrymple M, Lasser G, Bishop P, Foster D.** High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice. *Nat Biotechnol*, v.14, p.867-871, 1996.
- Rath D, Ruiz S, Sieg B.** Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Vet Rec*, v.152, p.400-401, 2003.
- Roy F, Maurel MC, Combes B, Vaiman D, Cribru EP, Lantier I, Pobel T, Deletang F, Combarrous Y, and Guillou F.** The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in

Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biol Reprod*, v.60, p.805-813, 1999.

Saharrea A, Valencia J, Balcazar A, Mejia O, Cerbon JL, Caballero V, Zarco, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*, v.50, p.1039-1052, 1998.

Seidel GE Jr, Schenk, JL Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, v.52, p.1407-1410, 1999.

Tian, X C, Kubota, C, Sakashita, K, Izaike, Y, Okano, R, Tabara, N, Curchoe, C, Jacob, L, Zhang, Y, **Smith S, Bormann C, Xu J, Sato M, Andrew S, Yang X.** Meat and milk compositions of bovine clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.102, p.6261-6266, 2005.

Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection *Nat Biotechnol*, v.23, p.445-451, 2005.

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.

Young MW, Meade H, Curling JM, Ziomek CA, Harvey M Production of recombinant antibodies in the milk of transgenic animals *Res. Immunol*, v.149, p.609-610, 1998.

Zhou Q, Kyazike J, Echelard Y, Meade HM, Higgins E, Cole ES, Edmunds T Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats *J Biotechnol*, V.117, p.57-72, 2005.
