

## BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EN ANIMALES SILVESTRES

### *Reproductive Biotechnology in Wild Animals*

H.M. Gonzales<sup>1\*</sup>, C. Scotto<sup>2</sup>, R. Davalos<sup>1</sup>, H. Gonzales Figueroa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología  
Animal Facultad de Ciencias  
Biológicas, Universidad Ricardo  
Palma.

<sup>2</sup> Laboratorio de Mejora Genética  
y Reproducción Animal.  
Facultad de Ciencias Naturales  
y Matemática de la  
Universidad Nacional Federico  
Villarreal.

\* Corresponding author  
H.M. Gonzales  
E-mail:  
[hugo.gonzales@urp.edu.pe](mailto:hugo.gonzales@urp.edu.pe)

Recibido: 12/12/19

Aceptado: 24/12/2019

Publicado: 31/12/2019

#### ABSTRACT

The interest in wildlife conservation has been increasing, mainly because many species have been disappearing. The main causes of this problem are the alteration, fragmentation or loss of habitats due to human action. To counteract the disappearance of these species, ex situ techniques of assisted reproduction have been developed to preserve and increase populations of endangered species in which zoos and conservation centers participate. These techniques are made up of captive breeding, the creation of banks of genetic resources and the use of reproductive biotechnologies, which include in vitro fertilization, artificial insemination and embryo transfer. To carry out these procedures, collections of both female and male gametes are made in advance, and then fertilization (assisted or in vitro). In addition, you can find other techniques that are not yet fully developed in wild animals, due to the lack of existing information about their reproductive physiology and embryonic development. Thus, it is increasingly sought to develop the biotechnological aspect of animal reproduction. The evolution of these techniques and the implementation of protocols for the reproduction of each species will allow us to approach the possibility of reducing the number of species declared in danger of extinction.

**Keywords:** assisted reproduction, wild species, conservation, genetic variability.

#### RESUMEN

El interés por la conservación de la fauna silvestre se ha ido incrementando, debido principalmente a que muchas especies han ido desapareciendo. Las principales causas de este problema se engloban en la alteración, fragmentación o la pérdida de hábitats por acción humana. Para contrarrestar la desaparición de estas especies, se han desarrollado técnicas ex situ de reproducción asistida para preservar e incrementar las poblaciones de especies amenazadas en las que participan zoológicos y centros de conservación. Estas técnicas se conforman por la cría en cautividad, la creación de bancos de recursos genéticos y el uso de las biotecnologías reproductivas, dentro de las cuales se hallan la fecundación in vitro, inseminación artificial y transferencia de embriones. Para llevar a cabo estos procedimientos, se realizan de antemano colectas de gametos tanto femeninos como masculinos, para luego realizar la fecundación (asistida o in vitro). Además, se pueden encontrar otras técnicas que aún no se encuentran del todo desarrolladas en animales silvestres, debido a la falta de información existente acerca de su fisiología reproductiva y desarrollo embrionario. Es así, que se busca cada vez más desarrollar el aspecto biotecnológico de la reproducción animal. La evolución de estas técnicas y la implementación de protocolos para la reproducción de cada especie permitirá acercarnos a la posibilidad de disminuir el número de especies declaradas en peligro de extinción.

**Palabras clave:** reproducción asistida, especies silvestres, conservación, variabilidad genética.

## INTRODUCCION

En la actualidad, el interés por la conservación de la fauna silvestre ha ido incrementando, debido a que, por acción humana, muchas especies han ido desapareciendo. Las principales causas de este problema se engloban en la alteración, fragmentación o pérdida de hábitats, caza furtiva, introducción de fauna exótica y tráfico ilegal de animales silvestres. En consecuencia, actualmente podemos encontrar un gran número de especies dentro de las categorías: vulnerable, en peligro o en peligro crítico.

Una de las soluciones más eficientes para este problema, es la preservación del hábitat, sin embargo, al no ser siempre factible, se han implementado técnicas complementarias ex situ para preservar e incrementar las poblaciones de especies amenazadas de gran importancia ecológica. Para poder considerar la posible reintroducción de estas especies la población en cautividad debe presentar el máximo de variabilidad genética posible para evitar problemas congénitos o endogámicos y que la reintroducción de individuos en el medio sea eficaz (Legendre, 2008).

Entre estas estrategias complementarias, podemos encontrar la cría en cautividad, bancos de recursos genéticos y el uso de biotecnología reproductiva (reproducción asistida) (Roldan y Garde, 2004). Respecto a la biotecnología reproductiva, existen programas realizados principalmente por zoológicos y centros de conservación, los cuales, en el transcurso de los últimos años, han ido desarrollando procedimientos de reproducción asistida para ciertas especies. Sin embargo, para el año 2015, solo se había reportado el estudio exhaustivo de la reproducción de 250 especies entre las cuales la mayoría eran de mamíferos y aves (Comizzoli, 2015). Esta baja tendencia, es debido a la falta de información existente respecto a la reproducción de la mayoría de las especies silvestres, ya que el acceso a estas es limitado y varía ampliamente hasta entre especies emparentadas, en consecuencia, es importante la previa experimentación para el establecimiento de protocolos de reproducción (Roldan & Garde, 2004). En la presente revisión se detallarán las técnicas biotecnológicas existentes para la reproducción ex situ de la fauna silvestre desarrolladas hasta la actualidad.

### 1. Colecta de ovocitos

Para poder proceder a una eventual inseminación artificial o cualquier otro método de reproducción asistida, es necesaria una recolección previa de gametos masculinos y femeninos (Comizzoli, 2015). Para la obtención de gametos femeninos, se procede a una sincronización del ciclo estral, así como una superovulación (De Souza et al., 2011). Sin embargo, como lo mencionan Legendre y Locatelli (2008), se concluyó en varios estudios que la superovulación in vivo se caracteriza por ser muy compleja y poco concluyente, por lo que se recomienda colectar ovocitos inmaduros, y ejercer una estimulación de la maduración de gametos in vitro.

En primer lugar, se realiza una evaluación de la funcionalidad del ovario en las hembras. Este se realiza generalmente mediante el análisis de metabolitos de esteroides excretados en la orina y/o las heces de la hembra, mediante un monitoreo endocrino durante un ciclo estral (Andraby y Maxwell, 2007). Tras la toma de muestras, se procede a realizar radioinmunoensayos o enzimoimmunoensayos para detectar la

presencia de las siguientes hormonas: hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH) y las gonadotropinas (Legendre y Locatelli, 2008). Otra tecnología empleada para el aseguramiento de las buenas funciones ováricas del aparato reproductor de las hembras es la ultrasonografía. Ambas técnicas, presentan la gran ventaja de no ser invasivas para el animal. Esta noción es sumamente importante, debido a que se trata generalmente de animales silvestres en peligro de extinción, siendo importante conservar el número de individuos restantes de dichas especies (Andraby y Maxwell, 2007).

Una vez verificado el buen funcionamiento de los ovarios y de los tractos reproductivos, la superovulación se realiza mediante la administración de hormonas estimuladoras. La idea principal es concentrarse en los folículos primordiales presentes en el córtex del ovario, ya que representan una reserva inmadura de ovocitos. Se procede, entonces, a una aspiración folicular (De Souza et al., 2011). La estimulación in vitro de la maduración de ovocitos se realiza con inyecciones de prostaglandina F<sub>2</sub>α, en el caso de los herbívoros y gonadotropina coriónica equina (eCG) o humana (hCG) en caso de felinos (Comizzoli, 2015).

Respecto a la maduración in vivo, la sincronización del ciclo estral se obtiene por la administración de progesterona. En el caso de los ciervos, como lo detallan en sus trabajos Legendre y Locatelli (2008), se introducen de manera intra-vaginal esponjas de acetato de fluorogestona durante unos 12 días, con el fin de provocar la luteolisis del cuerpo amarillo. Al momento de retirar el implante hormonal, se observa una caída rápida de la tasa de progesterona, la cual ya no cumple la función de retroalimentación negativa en la FSH, permitiendo así su liberación y la emergencia de un folículo dominante. Cabe resaltar que incluso en ciertos casos post mortem, la colecta de ovocitos sigue siendo posible (De Souza et al., 2011; Legendre y Locatelli, 2008).

Actualmente, los protocolos de estimulación ovárica y superovulación en felinos salvajes han reportado el uso de gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG). Estas dos hormonas son complejos grandes de gonadotropinas exógenas, siendo las más utilizadas debido a su larga vida media en circulación (24h-48h) y a su buena respuesta ovárica en una sola aplicación. Otras hormonas que han sido utilizadas con éxito son la hormona estimulante del folículo de porcino (pFSH) y la hormona luteinizante porcina (pLH). Sin embargo, estas se caracterizan por ser de corta vida media (~ 2h) y por lo tanto no tienen una buena respuesta ovárica. La combinación eCG/hCG ha sido reportada con éxito en diversos felinos como tigres (*Panthera tigris*), leopardos nublados (*Neofelis nebulosa*), pumas (*Puma concolor*), ocelotes (*Leopardus pardalis*), guepardos (*Acinonyx jubatus*) y tigrinas (*Leopardus tigrinus*). No obstante, la administración continua o repetitiva de gonadotropinas exógenas en tiempos de intervalos cortos origina la reducción de la estimulación ovárica (Rodríguez, 2012).

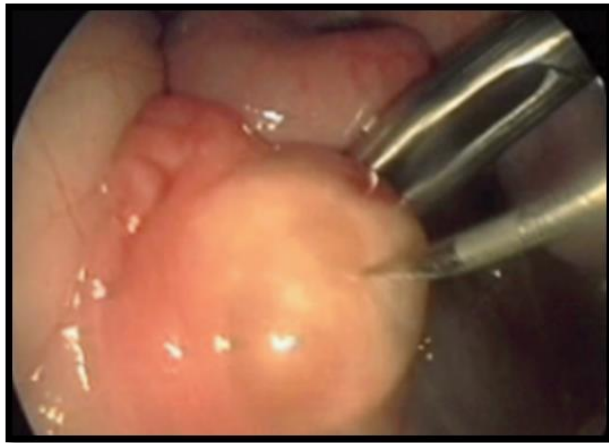


Figura 1. Vista del ovario, por endoscopia, durante la aspiración folicular (Legendre y Locatelli, 2008).

## 2. Colecta de semen

El método de colecta de semen consiste en extraer mediante diversos métodos muestras espermáticas, para su posterior conservación o uso. Esta técnica presenta diversas ventajas como: la preservación y uso de germoplasma sin limitación de tiempo y espacio, intercambio de material genético entre individuos alejados geográficamente (fragmentación de hábitats) y prevención de problemas sanitarios. En animales silvestres los métodos de colección de semen varían por grupo, peces (masaje abdominal), anfibios, (masaje abdominal), reptiles - serpientes (masaje del tercio caudal ventral) y aves (masaje de la cloaca hasta proyectar los cuerpos fállicos). (Oliveri, 2018). A diferencia de los grupos previamente mencionados, el de mamíferos presenta mayor dificultad, ya que a comparación de la colecta en animales domésticos (entrenamiento de machos con ayuda de una vagina artificial), estos no se encuentran acostumbrados a estar en contacto con humanos, por lo que se necesita un manejo diferente. En lo mamíferos, existen dos tipos de colecta, por electroeyaculación y selección de espermatozoides del epidídimo (tras la castración o de individuos muertos). En todos los casos, los espermatozoides recolectados pueden ser suspendidos en suero salino fisiológico o en un medio de cultivo para luego ser usados o preservados (Roldan y Garde, 2004).

En la electroeyaculación, se procede a obtener el semen mediante el uso de un electroeyaculador, el cual produce estímulos eléctricos de baja intensidad en el órgano reproductor del animal anestesiado (Polo et al, 2009). Presenta bajos riesgos para los individuos y puede realizarse repetitivamente. (Roldan y Garde, 2004). Es el método más utilizado en mamíferos silvestres, (desde ratones hasta elefantes). Sin embargo, una de las desventajas de usar este método, es que en algunas especies (felinos) puede darse la contaminación por orina, producida cuando la tensión supera el nivel mínimo necesario para la eyaculación o cuando el electrodo está colocado en el cráneo. Una alternativa para minimizar este problema sería la cateterización o cistocentesis antes de iniciar el procedimiento (Rodríguez, 2012). En un estudio realizado por Huang et al., 2012 en el Centro de Conservación e Investigación de China, se determinó que entre las especies que no presentan dicho problema podemos encontrar a *Ailuropoda melanoleuca* "Panda gigante".

El protocolo de electroeyaculación varía por cada especie, mientras que para *Papio anubis* "Babuíno anubis" son necesarios entre 5 a 7 estimulaciones por 2 a 3 segundos de 10 V, para *Ailuropoda melanoleuca* "Panda gigante" se necesitan tres electrodos, entre 20 a 30 estimulaciones por 2 a 3 segundos de 2 a 8 V.

El otro tipo de colecta de semen existente es mediante la recuperación células espermáticas viables del epidídimo, pudiendo ser obtenido tras una castración o de especímenes muertos (tras varias horas o pocos días post-mortem). Siendo una buena posibilidad para las especies que son constantemente atropelladas o cazadas. (Roldan y Garde, 2004). Por otro lado, De Souza, et al, en el año 2011 observaron que esta forma de colecta es mucho más eficaz en algunas especies como gacelas, debido al proceso de maduración celular y presentaba mayor fertilidad.

En el caso de los gatos salvajes, los espermatozoides vivos se pueden recuperar en las primeras doce horas de aislamiento del epidídimo, para esto el órgano debe ser lavado y homogeneizado en medio HEPES, para luego recuperar el esperma tras centrifugación. En los animales vasectomizados, el semen se recolecta por aspiración de la cola del epidídimo usando jeringa (con medio HEPES) y aguja, para luego recuperar los espermatozoides por centrifugación. Se sabe que los espermatozoides recuperados del epidídimo de los gatos son móviles, viables y capaces de penetrar los ovocitos. Sin embargo, los espermatozoides epididimales tienen naturalmente más gotas citoplásmicas, que normalmente se pierden durante el transporte a través del conducto (Rodríguez, 2012).



Figura 2. Colección de semen de una rana pananiana dorada. (P. Camizzoli. Advanced biotechnologies for wildlife fertility preservation)

### 3. Vitriificación y criopreservación

La criopreservación forma parte de un conjunto de tecnologías de reproducción asistida, que hace uso de temperaturas muy bajas para preservar a largo plazo una diversidad de muestras biológicas (como embriones, óvulos, espermatozoides y tejidos) obtenidas *in vitro* con lo cual se permitiría a su vez preservar una alta diversidad genética en poblaciones en peligro crítico (Hermes et al., 2019).

La criopreservación espermática consiste en un proceso de congelación lenta, en el cual se puede iniciar con la dilución de la muestra espermática en una solución extensora de semen, seguido de una incubación a 37°C x 10min y la toma de

muestra con pajuelas que contenga el crioprotector (glicerol) y criodiluyente (entre los existentes, el compuesto por yema de huevo presenta mayor aplicación) o la dilución directa de la muestra en tampón de yema de huevo TEST. Luego se procede al congelamiento a 4°C y prosigue con el enfriamiento gradual de las muestras, al colocarlas sobre una fuente de nitrógeno líquido (Nitrógeno líquido, siglas NL) a diferentes alturas hasta sumergirlas en el NL (Huang et al., 2012 y Hermes et al., 2019, Roldan y Garde, 2004; Sánchez et al., 2015).

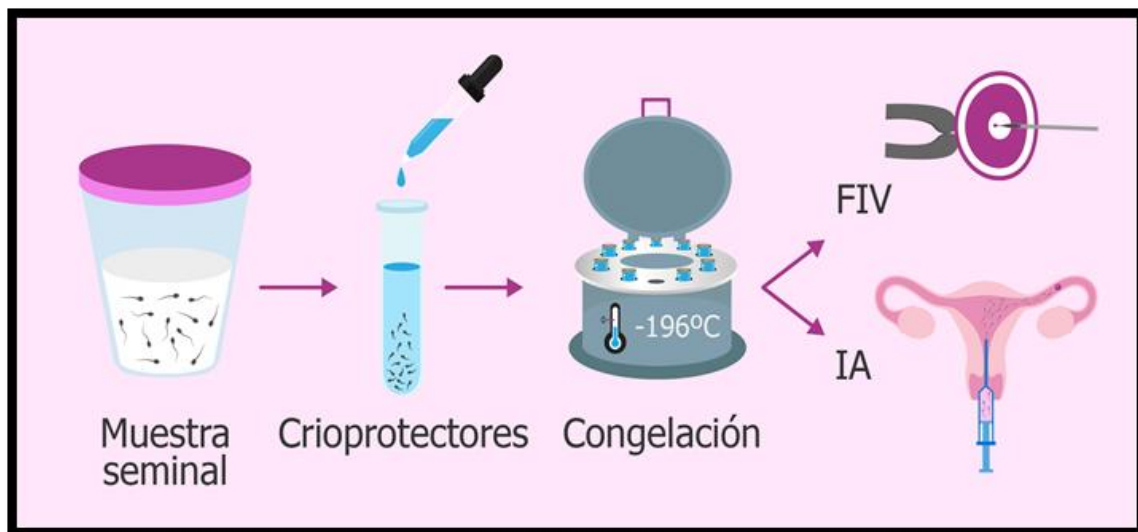


Figura 3. Procedimiento simplificado de la criopreservación espermática (Tomado de: <https://ovodonante.com/ovodonacion-con-ovulos-frescos-o-congelados/>)

En la criopreservación de ovocitos, si estos se congelan demasiado rápido puede formarse cristales de hielo que pueden dañar a los organelos, y, por el contrario, si la congelación del ovocito es lenta puede provocar la deshidratación y el aumento de solutos nocivos (Zarate, 2006). Por ello, en la vitriificación de ovocitos. Este proceso consiste

primero en la obtención de los ovocitos por estimulación ovárica con hormonas que luego serán tomadas mediante punción ovárica, los ovocitos recolectados se clasificaron y seleccionarán antes de realizar una congelación ultrarápida de 22°C a -196°C utilizando NL.

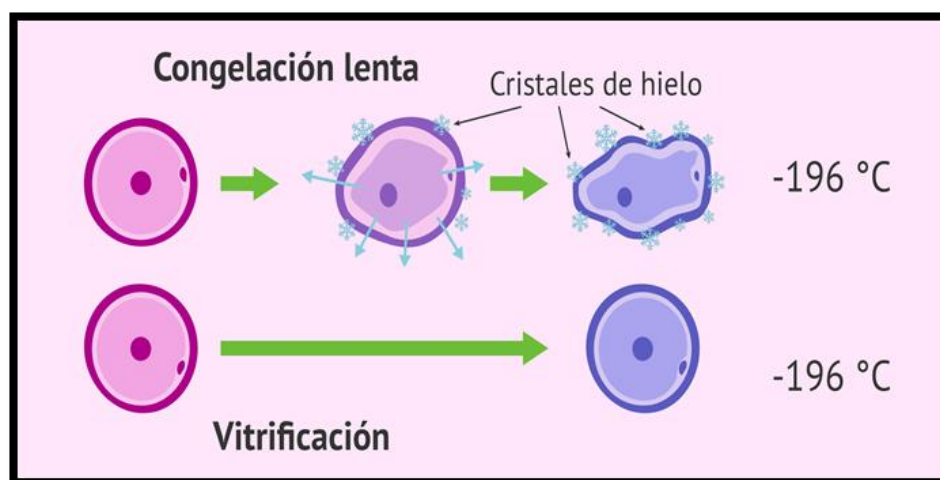


Figura 4. Congelación lenta y vitriificación de óvulos (Tomado de: <https://ovodonante.com/ovodonacion-con-ovulos-frescos-o-congelados/>)

Dentro de la criopreservación podemos encontrar la vitrificación, la cual es una técnica derivada de la anterior en donde la célula y su entorno se solidifican sin que se formen cristales de hielo sino por la extrema elevación de la viscosidad durante el enfriamiento, dando lugar a un estado de vítreo (Ruiz et al., 2010; Sánchez et al., 2015). La solidificación se realiza utilizando cantidades mínimas de agentes crioprotectores en gran concentración y una velocidad de enfriamiento elevada. El desarrollo de esta técnica conlleva al uso de crioprotectores de menor toxicidad o de una combinación de estos, significando la reducción del efecto tóxico en la criopreservación de embriones, aumentando la supervivencia de los embriones a casi el 100%. Dentro de la vitrificación existen dos formas de llevarla a cabo:

a) No aséptica o Formación de gotas → Esta técnica implica la formación de gotas de solución vitrificantes, en donde se colocarán las muestras a crioconservar, para luego ser colocadas directamente en el NL. Suele ser usada en trabajos con bovinos.



Figura 5. Método de vitrificación no aséptica (Tomada de: Sánchez et al., 2010).

b) Aséptica o Open-Pulled Straw → Esta técnica consta de adelgazar una pajuela o pajilla de 0.25 ml calentándola en platina, estirándola hasta tener un diámetro interior de 0.7 - 0.8 mm, en donde se cortará en su zona más delgada; las muestras a crioconservar se recogerán con la parte más fina y se realizarán inmersiones en NL. Esta técnica es usada principalmente para realizar la vitrificación espermática.

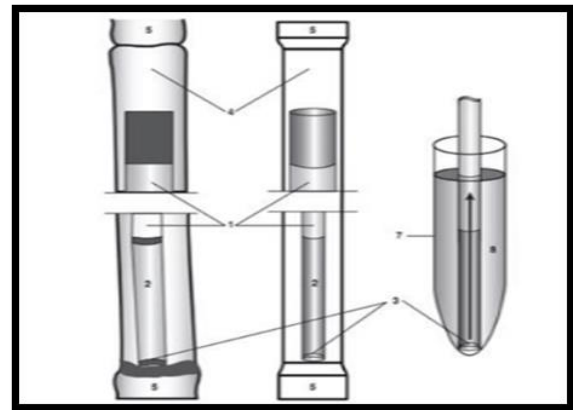


Figura 6. Método de vitrificación aséptica (Tomada de: Sánchez et al., 2010)

#### 4. Inseminación artificial

La inseminación artificial consiste en la utilización de técnicas no invasivas para depositar el semen, previamente recolectado y conservado, con espermatozoides viables, en el tracto genital femenino (vagina o útero) (Roldán y Garde, 2004). Para obtener mejores resultados, se recurre a la sincronización de los ciclos hormonales de las hembras, mediante dispositivos vaginales de liberación de hormonas esteroides (progesterona), tratamiento luteolítico con prostaglandinas, y gonadotrofinas que inducen la ovulación (Comizzoli, 2016). Mediante el empleo de semen criogenizado, se han obtenido resultados en 16 especies de mamíferos silvestres, entre los cuales encontramos a *Rucervus eldii* "ciervo de Eld", puma, tigre y leopardo. Sin embargo, la aplicación de esta técnica en animales silvestres aún es bajo, debido a la carencia de información respecto a la fisiología reproductiva femenina de animales silvestres.

Uno de los pocos programas de cría y reproducción de especies silvestres con una larga historia en el manejo de técnicas reproductivas, es el programa de reproducción y conservación de pandas gigantes, el cual a través de los años fue mejorando protocolos de inseminación artificial en esta especie. Es debido a esto, que ya existe una metodología establecida de inseminación artificial (IA) en pandas, el cual se inicia con el anestesiamiento de las hembras, para luego proceder con la inserción de un catéter de acero inoxidable en el orificio cervical externo. Tras esto, el inyector de semen debe ser ubicado dentro del catéter de 300 mm de longitud, para luego transferir, con ayuda de una jeringa, el semen fresco o descongelado al catéter. Este se deposita en el útero de la hembra en posición supina, y sus cuartos traseros mantenidos en un ángulo de 45° por 5 minutos, esto para evitar el reflujo de la bóveda vaginal (Huang et al., 2012)

No obstante, a pesar de que las técnicas de inseminación artificial se presentan como una opción a los múltiples problemas asociados a la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción, el panda gigante, no muestran datos significativamente favorables tras procedimientos de IA. En el estudio realizado por Li et al, 2017 se analiza la eficacia de los métodos de apareamiento natural e IA. en donde se indica que el uso de IA., tiene un éxito

considerablemente menor en comparación a los métodos de apareamiento natural y la combinación de ambos, siendo las tasas de natalidad 18.5%, 60.7% y 50.6% respectivamente en un período analizado de 21 años (1996 a 2016). Los autores asocian el bajo rendimiento reproductivo de la IA. al estrés generado por los procedimientos de captura y

anestesiamiento previos al procedimiento. Además, suponen que el comportamiento de elección de pareja podría optimizar la compatibilidad genética. Sin embargo, esto aún se encuentra en estudio.



Figura 7. Inseminación artificial de una hembra de oso panda gigante en el zoológico "Zoo Aquarium de Madrid" Periódico, El Mundo (09/04/16).

## 5. Obtención de embriones

La obtención de embriones ofrece una gran ventaja sobre la inseminación artificial, esto debido a que la contribución genética de las hembras se ve incrementada en relación a la gestación y a su vez reduce los intervalos generacionales, lo que permite una forma "ilimitada" en la renovación de animales (Roldán y Garde, 2004).

En especies silvestres, no existen suficientes trabajos que demuestren que haya potencial en la obtención de embriones salvo en casos aislados registrados, de ungulados (Comizzoli et al., 2010). La principal limitación en esta técnica es debido al uso, casi obligatorio, de tratamientos de superovulación en los animales, pues se dan diversas respuestas ováricas a causa del estrés generado por manipulación previa de la recolección de embriones. El tratamiento mismo puede dar lugar a efectos contraproducentes, un ejemplo de ello sería la producción de

anticuerpos neutralizantes que provoquen la reducción en la respuesta ovárica a futuros tratamientos (Roldán y Garde, 2004).

La obtención de embriones puede ser in vivo o in vitro.

La producción in vitro (PIV) de embriones es una de las técnicas más eficientes y también unos de los métodos más costosos para la propagación de poblaciones (Comizzoli et al., 2000). Posee tres fundamentos, independientes del protocolo utilizado, que pueden afectar los resultados finales del proceso (Ruiz y Astiz, 2010; Herradón et al., 2007):

- a) Maduración in vitro (MIV)
- b) Fecundación in vitro (FIV)
- c) Cultivo in vitro de embriones (CIV)

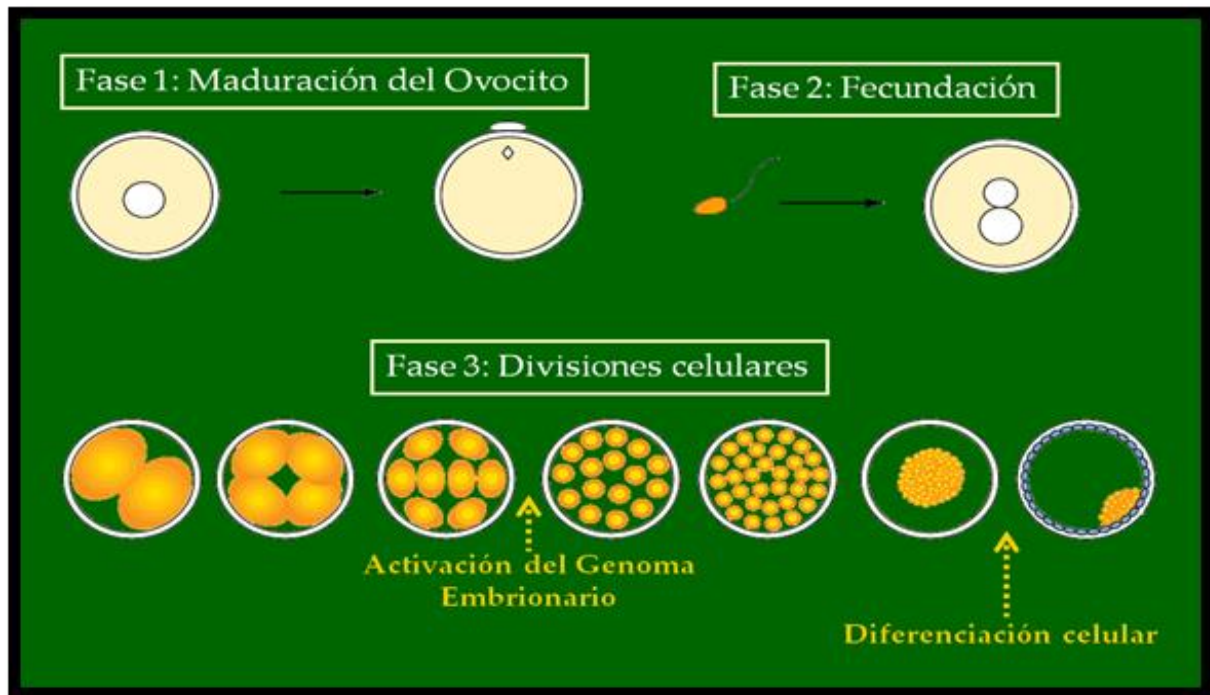


Figura 8. Fases fundamentales en PIV de embriones (Tomado de: [http://www.noticiascientificas.info/2010/12/produccion-de-embriones-in-vitro\\_25.html](http://www.noticiascientificas.info/2010/12/produccion-de-embriones-in-vitro_25.html)).

## 6. Fecundación in vitro

Esta técnica consiste en la fecundación de un óvulo por parte de un espermatozoide fuera del cuerpo de la hembra, para luego transferir el o los embriones al útero de esta. Se desarrolló en los años 60 en animales de laboratorio y se empleó con éxito por primera vez en 1978 en seres humanos y en 1982 en bovinos. Esta técnica presenta mejores opciones frente a las otras técnicas, para la reproducción asistida de animales silvestres, ya que no necesita un control en la hembra para la obtención de ovocitos, permite adquirir más embriones, la posibilidad de que individuos infértiles tengan descendencia, reduce la cantidad mínima de células espermáticas viables necesarias para la fecundación y da la posibilidad de que gametos, conservados por criogenización, se fecunden. Hasta ahora, se ha logrado obtener crías mediante esta técnica en felinos, primates y ungulados (Roldán y Garde, 2004).

## 7. Microinyección de espermatozoides

Comenzó a experimentarse en los años 70 en animales de laboratorio y se empleó con éxito por primera vez en humanos en el año 1992 (Roldan y Garde, 2004).

En efecto, en ciertos casos, el semen resulta ser de baja calidad: poca cantidad de espermatozoides, motilidad limitada o morfología anormal. En estos ejemplos, que generalmente se observan en macho muy consanguíneos o cuando la supervivencia del semen se ve muy limitada, no se puede recurrir a un proceso inseminación artificial (Roldán et al., 2004). Se desarrolló entonces un método de inyección intracitoplasmática de esperma a dentro del óvulo (Camizzoli et al., 2000). En este caso, no se necesita experimento previo de capacidad de fecundación por parte del espermatozoide

ya que se introduce directamente por dentro del citoplasma del ovocito un solo espermatozoide (Roldán et al., 2004).



Figura 9. Fecundación in vitro mediante embrioscopia (Tomada de: <https://mexicofertil.com/tag/donante/>)

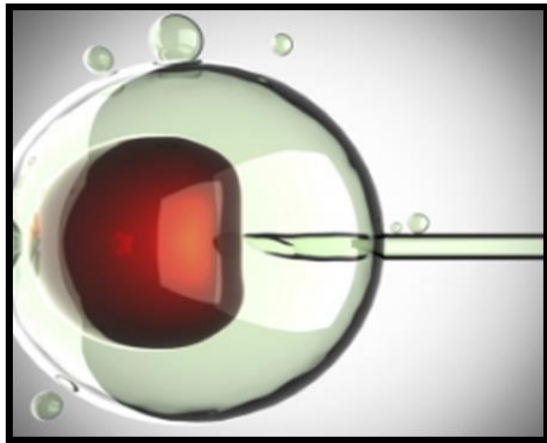


Figura 10. Microinyección de espermatozoide en óvulo (Tomado de: P. Camizzoli. Advanced biotechnologies for wildlife fertility preservation)

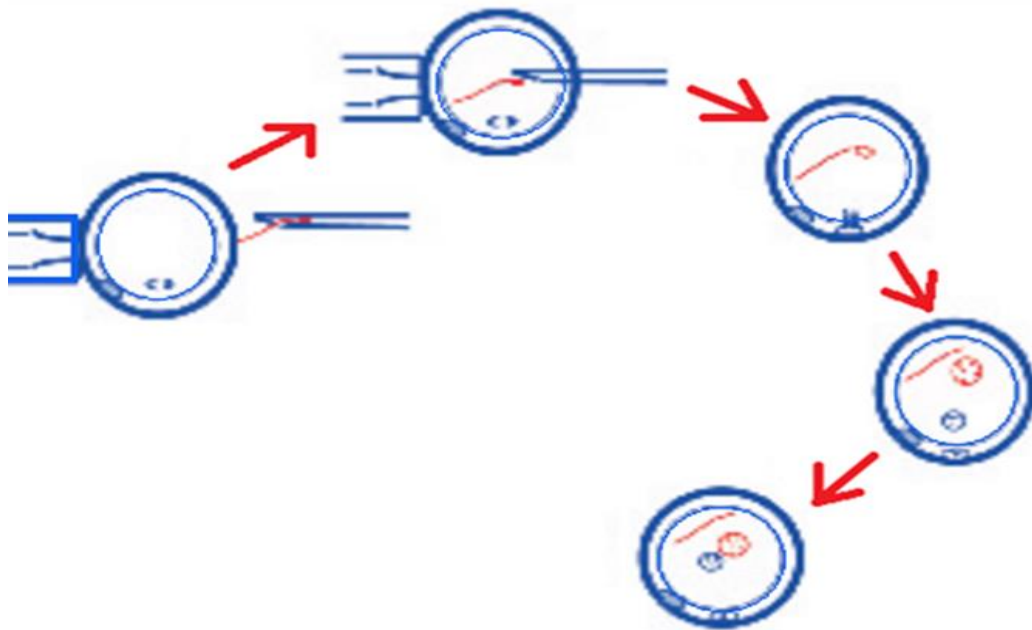


Figura 11. Inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI). (Tomado de: Roldán y Garde, 2004. Los retos medioambientales del siglo XXI: La conservación de la biodiversidad en España. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción)

## 8. Transferencia de embriones

La transferencia de embriones es una técnica de reproducción asistida utilizada particularmente cuando el número de individuos existentes es muy limitado. Se realiza mediante la obtención de embriones que se recuperan del tracto reproductivo de una hembra donante y se transfieren al tracto de una hembra receptora, que está sincronizada hormonalmente con la hembra donante. El éxito de esta técnica depende principalmente de la elección de la combinación donante-receptora. La primera transferencia de embriones de mamíferos exitosa fue realizada por Heape a finales del siglo XIX (Roldán y Garde, 2004).

En especies salvajes, se han obtenido nacimientos en un variado número de especies, siendo el primer éxito conocido, la transferencia interespecífica de embriones entre la oveja salvaje "*Ovis musimon*" y la oveja doméstica "*Ovis aries*". A

partir de ese éxito se han transferido con éxito embriones en distintas combinaciones de especies salvajes a especies domésticas, otro ejemplo, es la transferencia de embriones de gato salvaje africano a gatos domésticos.

Aun con los éxitos logrados, se han registrado casos donde ocurren reabsorciones tempranas de los embriones, abortos y malformaciones en fetos, o presencia de problemas en la hembra receptora durante la gestación (Roldán y Garde, 2004). Todo esto a causa de incompatibilidades inmunológicas entre el embrión y la hembra receptora. El conocimiento de estos problemas y de los procesos responsables que dieron lugar al fallo de la técnica, permitirán que se desarrollen mejores programas de reproducción asistida y de clonación (Pukazhenthil y Wildt, 2003).





Figura 12. Transferencia interespecífica de embriones de gato salvaje a gato doméstico (Tomado de: Audubon Nature Institute, New Orleans, Louisiana, USA).

## 9. Clonación

Es una técnica en donde el núcleo de una célula (de un donante) se introduce en una célula sin núcleo (desnucleada), para luego formar un nuevo embrión (Comizzoli et al., 2000). Existe una gran controversia respecto a la posible aplicación de la clonación a la conservación de especies en peligro de extinción (Roldán & Julián, 2004). Sin embargo, las dificultades de la clonación no solo se deben a que la técnica es imperfecta, sino que el núcleo celular procede de una célula corporal totalmente desarrollada, en el cual ciertos segmentos de genes

están bloqueados (Comizzoli, 2016). El zoólogo alemán Hans Spemann en 1869 experimentó con embriones de salamandra, mediante el suministro retrasado del núcleo, inhibió parcialmente un óvulo fecundado (zigoto), es decir el núcleo celular se desplazó a un lado por estrangulación, solo fecundándose esa mitad (Renneberg, 2008). La técnica de clonación comenzó en anfibios hace más de 60 años, y fue desarrollándose en animales domésticos durante los años 80 y 90's; culminando con el nacimiento de "Dolly", el primer individuo clonado a partir de células adultas (Roldan y Garde, 2004).

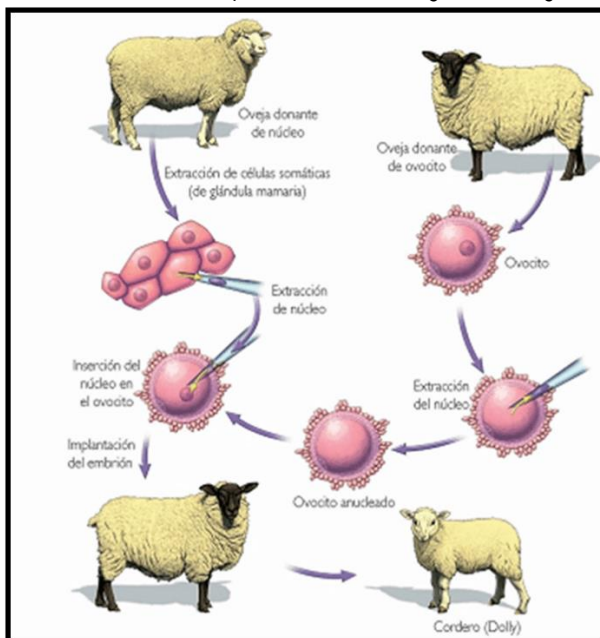


Figura 13. Procedimiento de clonación (Tomado de: [https://1.bp.blogspot.com/-SUEN\\_1\\_zlQ/U0sZkZ4nTfI/AAAAAAAAAo4/RXi1PjBliW8/s1600/clonaci%C3%B3n.png](https://1.bp.blogspot.com/-SUEN_1_zlQ/U0sZkZ4nTfI/AAAAAAAAAo4/RXi1PjBliW8/s1600/clonaci%C3%B3n.png))

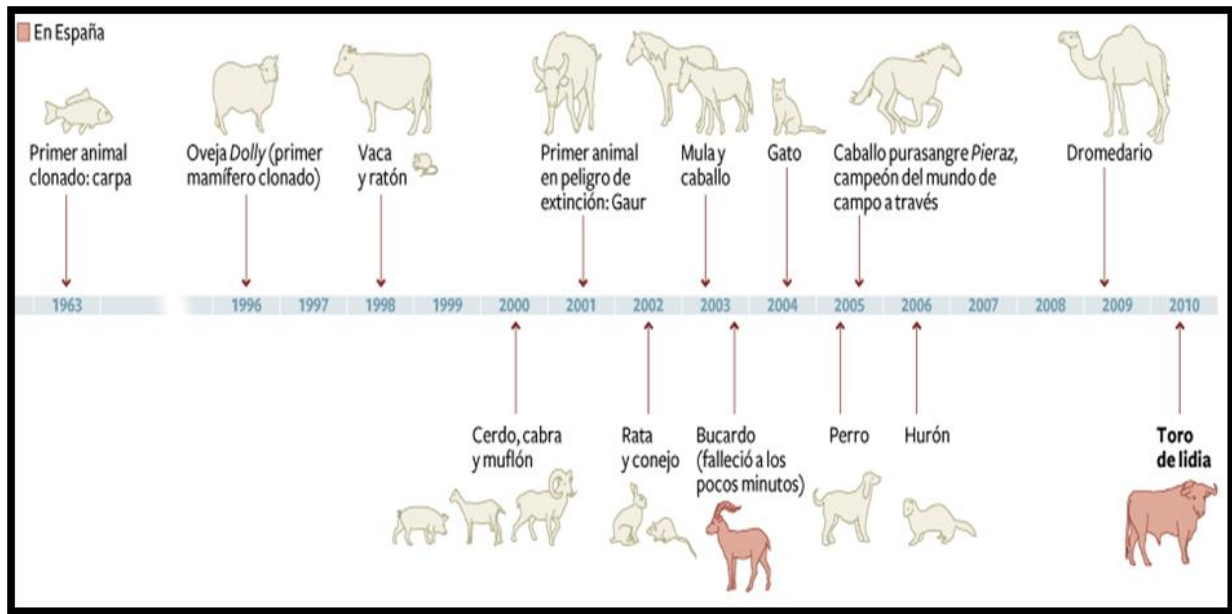


Figura 14. Línea de tiempo sobre animales clonados en España (Tomado de: Grupo Europeo de Ética para Ciencia de la Comisión Europea y elaboración propia/ Herber Longás-El país)

## 10. Preselección de sexo

La determinación del sexo está relacionada con la presencia de los cromosomas sexuales (Castro, 2007). Es posible detectar el sexo de los embriones obtenidos mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y biopsia de blastómeros. En primer lugar, los embriones se llevan hasta la fase de ocho células. Luego, una de las células se retira mediante un micromanipulador, el resto de las células seguirá creciendo normalmente. Después, se procede a extraer el DNA de la célula individual separada y se retira una región del cromosoma "Y", se procede a una electroforesis, tras marcar con bromuro de etidio, aparecerá una banda visible de DNA en caso de que individuo sea macho; de lo contrario, si no aparece la banda, este será hembra. De esta manera, se podrá obtener de forma selectiva individuos machos o hembras, según lo deseado. Este método presenta muchos inconvenientes en la aplicación de especies silvestres, ya que se necesita de una infraestructura compleja y posee una baja eficiencia. (Rojas et al., 2006). Otra técnica utilizada, es la separación espermática por citometría de flujo de los espermatozoides X e Y, siendo actualmente el único método eficaz para la obtención de descendencia de sexo deseado. Además, favorece la posibilidad de selección del sexo de las crías y podría contribuir sustancialmente a un mejor aprovechamiento del espacio disponible para alojamiento del animal y a una mejor programación genética de conservación en animales silvestres (Roldán y Julián, 2004).

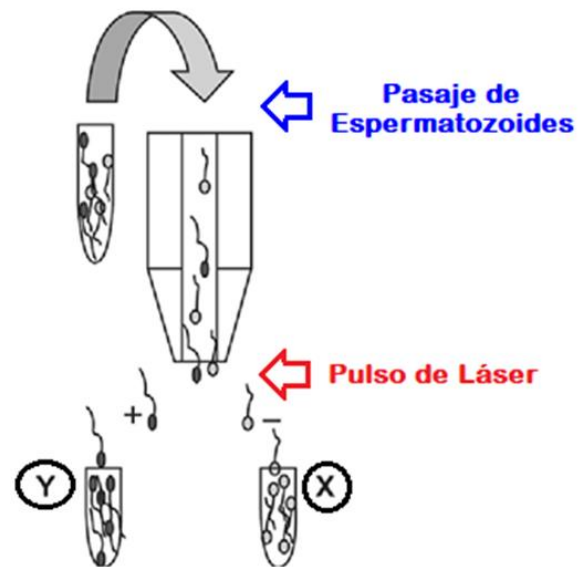


Figura 15. Esquema para sexado del semen (Mejorado de: <https://www.semanticscholar.org/paper/SWISS-%C3%97-HOLSTEIN-CROSSBRED-COWS-COMPARED-TO-PURE-%2C/56a9dc69d19306e5da5096d72b68b205602c93a2>)

## 11. Bancos de ADN y células somáticas

En la actualidad, las células somáticas sólo han sido destinadas a la investigación y aún no han sido usadas en procesos de reproducción asistida. Sin embargo, se han creado bancos tanto de ADN, como de células somáticas de especies en peligro de extinción, puesto que, en un futuro próximo, se podrán utilizar como material clave en técnicas de clonación

(Roldán y Gomendio, 2010). La creación de un banco de recursos genéticos (GRB) de animales silvestres permitirá evitar la pérdida de la biodiversidad (Comizzoli et al., 2000; De Souza et al., 2011). Un banco genético permite conservar semen, ovocitos, embriones e incluso tejidos o ADN de individuos, y así restablecer una población en particular que haya desaparecido después de un desastre, o de un episodio epidémico (De Souza et al., 2011). Según Andrabi y Maxwell (2007), si se hubiera establecido un banco de recursos genéticos, antes de la explosión del reactor nuclear de Chernóbil, se habría podido reintroducir especies silvestres que desaparecieron tras la catástrofe.

Los biomateriales como tejidos ováricos y testiculares o dérmicos son sistemáticamente incluidos en un banco de colecta, ya que surge la necesidad de conservar a lo largo del tiempo y del espacio, muestras de animales susceptibles a desaparecer algún día (Comizzoli, 2015; Rojas et al., 2006). El GRB se caracteriza por ser una herramienta más para el manejo de la diversidad genética en los programas de conservación in y ex situ. (Andrabi y Maxwell, 2007). En el caso del establecimiento de bancos de recursos genómicos, la obtención de células somáticas diploides puede darse a través de biopsias, raspados de mucosa bucal o a partir de folículos pilosos (Castro, 2007).

Para alcanzar la meta de la creación de un banco de células somáticas, y de ADN, es necesario realizar una colecta de células. Generalmente, se hacen por una biopsia de la dermis de la oreja, como lo describen Rojas et al. (2006). La muestra biológica así obtenida será procesada con materiales estériles a lo largo del procedimiento. Además, se destaca la urgencia de conservar y desarrollar las células en condiciones parecidas, sino iguales, a las de las que gozan en su estado natural: pH, temperatura, nutrientes del medio extracelular, osmolaridad, y viscosidad entre otros (Castro, 2007). Las células fibroblásticas obtenidas serán en un primer paso, evaluadas al microscopio, como control de la calidad del material genético (Rojas et al., 2006).

En su trabajo, Castro (2007) describe el protocolo empleado en la constitución de un banco genético del gato güiña (*Oncifelis guigna*). Se coloca la muestra en Buffer Fosfato Salino (PBS) para proceder a su lavado y su fragmentación en microfragmentos antes de ser sembradas en medio DMEM con FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) en placas de cultivo. La placa es incubada a 38°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Rojas et al., 2006; Castro, 2007). Después de dos días, las células son repicadas en un nuevo medio DMEM. Después de 15 días de incubación, se centrifuga el medio obtenido y se siembra el precipitado. Las células así obtenidas serán congeladas posteriormente en el agente crioprotector dimetil sulfóxido (DMSO) con 10% de suero fetal bovino (Castro, 2007). Se procede entonces a la congelación de las células obtenidas, de manera lenta y progresiva, pasando de -20°C durante una hora, a -80°C durante otra hora para finalmente llegar a -196°C en NL.

Aunque todavía no se ha logrado, se considera clonar animales usando fibroblastos conservados en bancos. Se inyectaría entonces los fibroblastos en el espacio perivitelino de los ovocitos y, por choques eléctricos, se fusionarían las membranas nucleares de ambos cuerpos, para así formar embriones (Rojas et al., 2006).

## 12. Reproducción artificial de peces nativos

Desde hace una década se viene ejecutando acciones de investigación básica aplicada sobre la reproducción artificial de las especies ícticas nativas en peligro de extinción (Proyecto Especial Lago Titicaca o PELT, 2018). Son peces del género *Orestia* como son: Carachi amarillo (*Orestias luteus*), Carachi negro (*Orestias Agassi*), Ispi (*Orestias ispi*), Boga (*Orestias pentlandii*). Y bagres andinos del género *Trichomycterus* como son el Suche (*Trichomycterus rivulatus*) y el Mauri (*Trichomycterus dispar*).



Figura 16. Colecta de ovocitos y fecundación artificial en peces nativos (Tomado de: Reproducción artificial peces nativos del Lago Titicaca. Produce. Puno. Perú)

### Futuros avances

La biotecnología reproductiva no ha terminado de desarrollarse, por lo que se espera que en los próximos años, se realicen avances claves en esta área, los cuales podrían permitir lograr los objetivos de los programas de conservación de animales silvestres en peligro de extinción.

#### a) Sexado de los embriones

Uno de los grandes problemas observados en el hábitat natural de los animales silvestres es el nacimiento excesivo de machos en proporción a las hembras. Esto representa un grave problema, considerando que la reproducción de estas especies se vea afectada por este fenómeno, y por entonces la conservación de estos animales. Por eso, se busca mejorar las técnicas de selección de sexo, con el fin de poder controlar el del embrión, ya que sería una herramienta clave en la contribución de los programas de conservación, balanceando así la proporción de cada género (Pukazhenthí y Wildt, 2004). En efecto, se sabe que los óvulos sólo llevan el cromosoma X, tanto como la mitad de los espermatozoides, mientras que la otra mitad lleva el cromosoma Y. Debido a esto, se concentraría el esfuerzo en separar los espermatozoides con cromosoma Y de los con cromosoma X, para luego, usarlos en una inseminación artificial o fecundación in vitro, y así elegir el sexo del futuro embrión (Roldán y Garde, 2004). Esta separación se podría realizar mediante una biopsia de blastómeros o con el uso de la biología molecular. Sin embargo, la citometría de flujo aparece hoy en día como la única técnica realmente fiable para separar de manera eficaz ambos tipos de espermatozoides (Roldán y Garde, 2004). En el caso de fecundación in vitro o de inseminación artificial, se

puede predecir el sexo en el 82% de los casos (Pukazhenthí & Wildt, 2004). Finalmente, la gran ventaja de esta técnica es que los embriones así sexados podrían ser vitrificados. En efecto, es sumamente importante tener cuidado con la proporción macho/hembra para no crear de manera involuntaria un desequilibrio de los sexos dentro de una población (De Souza et al., 2011).

#### b) Xenoinjerto de tejido ovárico y trasplante de espermatogonias

Por otra parte, en algunos casos, sería interesante proporcionar a ciertos animales mejor capacidad de producción de gametos. El xenoinjerto de tejido ovárico consistiría en el trasplante de tejido ovárico funcional de una hembra a otra, para permitir la generación de ovocitos de buena calidad. Este proceso es permitido por el hecho de que el trasplante se pueda hacer independientemente de la edad, del ciclo reproductivo o de eventos post-mortem (en caso de que se tratara de un donador fallecido), como lo relatan De Souzas et al. (2011). En cuanto a los machos, se busca trasplantar células primitivas, espermatogonias o espermatocitos del testículo de un donador al testículo de un animal huésped (Roldán et al., 2004).

Sin embargo, para que se logren estos avances, se necesita adquirir más información acerca a los procesos reproductivos propios a cada especie, sobre todo en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Legendre y Locatelli, 2008).

## CONCLUSIÓN

En los últimos años, se ha tomado conciencia de la desaparición progresiva e irreversible de varias especies de animales silvestres. Debido a esto, es de suma importancia, protegerlas y mejorar las técnicas de reproducción asistida existentes en animales silvestres, como la fecundación in vitro, la inseminación artificial y los diversos procesos de conservación y preservación de gametos (siendo necesario en especies vulnerables para conservar la variabilidad genética). Aún falta mejorar muchos aspectos con el fin de obtener una mayor tasa de éxito reproductivo. Además, se necesita enriquecer los conocimientos respecto a las primeras etapas del desarrollo embrionario de las especies silvestres, la fisiología reproductiva en hembras y establecer protocolos para la reproducción de cada especie. Por otro lado, cada avance logrado en el campo de la biotecnología animal nos permitirá acercarnos a la posibilidad de disminuir el número de especies declaradas en peligro de extinción.

## REFERENCIAS

- Andrabi S, Maxwell W. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, 2007; 99(3): 223-243.
- Apaza R. Reproducción artificial peces nativos del Lago Titicaca. Produce. Puno. 2016. Perú. Recuperado de [http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/1/jer/PR\\_OPECA\\_OTRO/difusion-publicaciones/pepa-puno/MANUAL%20REPRODUCCION%20SPP%20NATIVAS\\_saman.pdf](http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/1/jer/PR_OPECA_OTRO/difusion-publicaciones/pepa-puno/MANUAL%20REPRODUCCION%20SPP%20NATIVAS_saman.pdf)
- Castro R. Establecimiento de un banco genético de células fibroblásticas de un ejemplar güiña (*Oncifelis guigna*). Memoria para optar el título profesional de médico veterinario. Universidad de Chile. 2007.19-43.
- Condori R, Quispe C, Ancco E, Dipaz D, Mellisho E. Sobrevivencia de blastocistos bovinos producidos in vitro vitrificados en dispositivos vitri-tip y vitri-top. *SPERMOVA*. 2019; 9(1): 48-52
- Comizzoli P. Advanced biotechnologies for wildlife fertility preservation. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 2016; 46(4): 541-545.
- Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development*, 2000; 40(5): 493-504.
- Comizzoli P, Songsasen N, Wildt DE. Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. In *Oncofertility* 2010; 87-100.
- De Souza J, Batista R, Melo L, Freitas V. Reproductive biotechnologies applied to the conservation of endangered ruminant - past, present and future. *Revista portuguesa de ciencias veterinarias*, 2011; 106(577):31-38.
- Europa Press, Madrid (9 de abril del 2016) Inseminan artificialmente a una hembra de oso panda en el zoo. El mundo. Recuperado de <https://www.elmundo.es/madrid/2016/04/09/5708f18522601dc0558b4610.html>
- Hermes R, Hildebrandt TB, Göritz F, Fasel NJ, Holtze S. First cryopreservation of phyllostomid bat sperm. *Theriogenology*. 20019; 131:28-31.
- Herradón PG, Quintela LA, Becerra JJ, Ruibal S, Fernández M. Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim*. 2007; 15: 1-8.
- Huang Y, Zhang H, Li D, Zhang G, Wei R, Huang Z, Zhou Y, Zhou Q, Liu Y, Wildt DE, Hull V. Relationship of the estrogen surge and multiple mates to cub paternity in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*): implications for optimal timing of copulation or artificial insemination. *Biol Reprod*. 2012; 87(5):112.
- Legendre X, Locatelli Y. Procréation assistée chez les cervidés : résultats, limites et perspectives. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 2008; 161(2): 145-149.
- Li D. Analizando el pasado para comprender el futuro: el apareamiento natural produce mejores tasas de reproducción que la inseminación artificial en el panda gigante. *Conservación biológica*, 2017; 216: 10-17.
- Long JA. Reproductive Biotechnology and Gene Mapping: Tools for Conserving Rare Breeds of Livestock. *Reprod Dom Anim*, 2008; 43 (Suppl. 2), 83-88
- Meddour A, Rouabah A, Meddour K, Loucif N, Remili A, Khatal Y. Expérimentations sur la reproduction artificielle de Sander lucioperca, Hypophthalmichthys molitrix, et Aristichthys nobilis en Algérie. *Sciences & Technologies*, 2005; 63-71.
- Oliveri M, Bartoskova A, Spadola F, Morici M, di Giuseppe M, Knotek Z. Method Of Semen Collection And Artificial Insemination In Snakes. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 2018; 27(2): 75-80.
- Polo JL, Milanés C, Ramón D, Martínez D, Días N, MacKenzie M, Rizo JM, Monsanto P, Quiala O, y Cabrera L. Evaluación del semen obtenido por electroeyaculación en primates no humano Babuíno Anubis (*Papio anubis*) mantenidos en el parque zoológico nacional de Cuba. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria [Internet]*. 2009;10(10):1-12. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617128010>
- Pukazhenthil BS, Wildt DE. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife?. *Reproduction, Fertility and Development*, 2003; 16(2): 33-46.
- Rojas M, Castro R, Alvarez R, Guillomot M, Venegas F. Impacto de la biotecnología reproductiva en la conservación de los animales en peligro de extinción. *Tecnovet*, 2006; 12(3): 9-15.
- Roldán E, Garde J. Los retos medioambientales del siglo XXI: La conservación de la biodiversidad en España. *Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción*. Monserrat Goendio. Fundación BBVA. 2004; 307-338.
- Rodrigues R. Wildlife cats reproductive biotechnology. *Current Frontiers in Criobiology*. 2012; 369 - 388.
- Ruiz S, Astiz S. Producción in vitro de embriones (PIV) en biotecnología de la reproducción bovina. *Asoc Nac Espec Med Bov en España*, 2010; 9(1), 25-32.

- Ruiz J, Correa JE, Martínez M. Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogenético de embriones. *Archivos de medicina veterinaria*, 2010; 42(1): 79-83.
- Sánchez R, Mansilla M, Risopatrón J, Schulz M, Isachenko V, Isachenko E. Vitrificación de espermatozoides en mamíferos. *SPERMOVA*. 2015; 5(2): 213-222
- Shivaji S. Conservation of wild animals by assisted reproduction and molecular marker technology. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2006; 41.
- Simón P, Álvarez A, Fuentes G. Choque hipoosmótico en espermatozoides de víbora de cascabel. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2016; 3(3). 52-57.
- Verma O. Assisted Reproductive Techniques in Farm Animal – From Artificial Insemination to Nanobiotechnology. *Vet. World*, 2012; 5(5): 301-310
- Zarate OE. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos (Doctoral dissertation, Tesis de Maestro]. Universidad Veracruzana. México). 2006.