

Capítulo LIII

Consideraciones sanitarias generales asociadas con la producción *in vitro* de embriones bovinos y su transferencia

**Carla Osorio-Meléndez
Amarú Pirela-Pirela**

El éxito continuo o permanente de la industria de producción *in vitro* (PIV) de embriones en Venezuela, depende en forma considerable del compromiso de los proveedores para garantizar que los embriones sean viables y libres de agentes infecciosos. Un desafío importante plasmado en la garantía de esta viabilidad y del estado sanitario de los mismos, depende también de la ética y técnica de los operadores que participan en todas las fases del proceso, desde la producción y recolección, hasta el almacenamiento, transporte y transferencia embrionaria. A nivel mundial, el logro creciente y más notable de esta biotecnología se ha instaurado desde el año 1982, cuando nació el primer ternero como resultado de la fecundación *in vitro* (Brackett *et al.*, 1982). Este hecho permitió que esta tecnología evolucionara de tal manera, que en la actualidad, la PIV de embriones bovinos es mayor de 330.000, con una transferencia a nivel global de 265.000 embriones (Thibier, 2006), por lo cual se ha convertido en un punto álgido y muy crucial en la interacción de los patógenos con los embriones.

Los desafíos involucrados con los puntos críticos de control que ayudan a identificar y cuantificar los riesgos sanitarios dentro de un laboratorio y a nivel de campo son propiciados por los investigadores y las autoridades reguladoras, los cuales ejercen la legislación y la práctica oportuna del uso seguro de numerosos avances y aplicaciones técnicas (Marquant-LeGuienne *et al.*, 2011). Aunado a esto, los embriones deben ser manipulados dentro de una cámara de flujo laminar utilizando materiales, medios y elementos de laboratorio esterilizados. En teoría, la presencia de patógenos en cualquiera de las muestras del sistema de PIV (por ejemplo, líquido folicular, complejo cúmulus-ovocito, células de la granulosa, células útero-tubáricas, medio de maduración, o medio de cultivo), podría resultar en la producción de embriones contaminados (OIE, 2007). Por lo tanto, como medida de control de calidad, es necesario revisar todas las muestras de manera rutinaria, para así evitar la presencia de patóge-

nos y garantizar un producto de alta calidad. Con el objetivo de producir embriones libres de agentes patógenos, se ha implementado una técnica de lavado y tratamiento con tripsina, el cual reduce el nivel de contaminación, pero su eficacia no ha sido probada. Sin embargo, con el mismo propósito se ha estudiado el uso de otras proteasas (Dinkins *et al.*, 2001) y la adición de agentes antivirales durante el período de cultivo (Givens *et al.*, 2006).

Considerando lo antes dicho, en el presente capítulo se proporcionará una descripción de los requerimientos sanitarios involucrados en los procedimientos de la PIV de embriones y su transferencia, los cuales se encuentran implícitamente relacionados con el bienestar animal. Los objetivos de este tema persiguen: brindar una perspectiva general de la investigación sobre las interacciones entre los agentes infecciosos (patógenos) y los embriones; evaluar los fundamentos sanitarios de la PIV de embriones y su transferencia y, considerar los métodos de reducción de riesgos y control de posibles agentes contaminantes dentro de un laboratorio de PIV de embriones.

RIESGOS SANITARIOS ASOCIADOS CON LA INTRODUCCIÓN DE CONTAMINANTES EN LA PIV

El éxito en la transferencia de embriones depende de la habilidad de realizar con sumo cuidado una serie de pasos técnicos y al mismo tiempo minimizar los factores que se conoce afectan el resultado de manera negativa. Para garantizar el éxito, es imprescindible adoptar medidas sanitarias en todas las etapas. La falta de higiene pondrá en riesgo la salud de las donadoras y receptoras, reducirá las tasas de preñez y aumentará el riesgo de transmitir infecciones cuando se transfieren los embriones. A continuación se mencionan algunos de los puntos que suelen ser las principales fuentes de intromisión de agentes patógenos en la PIV.

Ovocitos, células somáticas y medios implementados en la PIV

Los virus pueden estar presentes en sangre o en fluidos corporales y propagarse a diversos tejidos y órganos, como el ovario; es posible que en la viremia presente en la etapa aguda de una enfermedad, los agentes infecciosos pueden contaminar a los ovocitos que estén en contacto, bien sea con el líquido folicular o las células de la granulosa del ovario, proceso de infección que se daría antes de la ovulación. En general, para la producción masiva de embriones PIV, los ovarios son recolectados aleatoriamente de animales muertos que clínicamente aparentan estar saludables; dichos ovarios son colocados en contenedores para su transporte y posterior procesamiento en el laboratorio de Fecundación *in vitro* (FIV).

La inclusión inadvertida de fluido folicular o sangre de un animal en etapa de infección puede causar el riesgo de contaminación cruzada de todos los ovarios y por ende, de los ovocitos que se obtienen posteriormente mediante la técnica de aspiración folicular. Algunas de las enfermedades que son consideradas como potente riesgo sanitario para los ovocitos post aspiración folicular están descritas en el Cuadro 1; al tomar como ejemplo los virus presentes en el líquido folicular tales como la diarrea viral bovina (DVB) y al herpesvirus bovino 1 (BHV-1), trae como consecuencia la producción de embriones contaminados (Bielanski 1994; 1995). Es importante desta-

car que es indispensable para ambos gametos estar libres de la DVB, BHV-1 y *Leptospira borgpetersenii*, ya que son las principales enfermedades consideradas como un riesgo potencial dentro de los sistemas de PIV de embriones.

Cuadro 1

Algunos agentes patógenos detectados en el tracto reproductivo de animales infectados de manera natural o experimental (Tomado y modificado de: Bielanski, 2011)

Patógeno ²	Ovario	Fluido folicular	Células oviductales /lavados	Células uterinas/lavados	Células del cúmulus-ovocitos	Ovocitos
BHV-1	+	+	+	+	+	+
DVB NCP	+	+	+	+	+	+
VIB	+	-	-	-	-	-
VLB	+	-	-	+	-	-
BTB	+	+	-	+	+	-
VFA	+	+	-	+	-	-
AV	+	+	-	-	-	-
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	+	+	+	-	-	+
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	+	+	+	+	+	-

¹+: detectado; -: no detectado. ²BHV-1: herpesvirus bovino-1; DVB NCP: virus de la diarrea viral bovina, cepa no citopática; BIV: virus de la inmunodeficiencia bovina; VLB: virus de la leucemia bovina; BTB: virus de lengua azul; VFA: virus de la fiebre aftosa; AV: virus de akabane.

Se debe prestar especial atención a la prevención de la introducción de patógenos mediante complementos de cultivo de origen biológico como el suero, la tripsina, las células de co-cultivo (por ejemplo, las células útero-tubáricas, las células del cúmulus-ovocito (COC´S) y las células uterinas. Tanto el suero como las células de co-cultivo aportan beneficios que son favorables para el crecimiento ovocitario y desarrollo embrionario, pero hay que tomar en cuenta que los mismos son un riesgo para la producción y crecimiento microbiano. Además, pueden producir la replicación microbiana en el sistema de FIV (por ejemplo, DVB o micoplasmas); sin embargo, se tiene preferencia por los medios químicamente definidos y que se encuentren ausentes de suero y células somáticas (Bielanski, 2011). Muchos medios pueden ser comprados como preparaciones estériles o esterilizados en el laboratorio antes de ser usados, pero como precaución estándar, las soluciones deben ser esterilizadas a través de un filtro de membrana (0,22 μ m) antes de ser usados.

El suero de hormonas y otros aditivos deben ser analizados rutinaria y sistemáticamente para detectar virus. El suero fetal bovino es de especial interés debido a que se ha encontrado ganado disponible para su comercialización conteniendo DVB y ocasionalmente HVB-1. Para eliminar el riesgo de infección del virus, el pretratamiento de embriones con compuestos antivirales ha sido reportado como una solución prometedora (Givens *et al.*, 2006). Pueden agregarse antibióticos al medio de cultivo sólo si su eficacia y potencial toxicidad a los ovocitos y embriones ha sido consi-

derada antes de su uso. Los ovocitos y embriones también pueden contaminarse mediante la exposición directa al nitrógeno líquido durante el proceso de vitrificación (Bielanski, 2011).

Introducción de contaminantes al FIV mediante el semen

Las pajuelas de semen criopreservado es una de las principales fuentes de transmisión y difusión de agentes patógenos tanto *in vitro* como *in vivo*, convirtiéndose en uno de los componentes de introducción de contaminantes más importantes dentro de los sistema de PIV, así como también, mediante la inseminación artificial (IA). En la FIV y otros procedimientos de fecundación asistida, el semen es procesado antes de ser utilizado, con el propósito de eliminar el plasma seminal, seleccionar los espermatozoides viables y lavar los espermatozoides en forma rigurosa, facilitando la capacitación espermática y la motilidad. A diferencia de la FIV, en la inyección intracitoplasmática, la ZP se perfora con una micropipeta para poder introducir el espermatozoide directamente en el ovocito, razón por la cual en esta técnica el riesgo de contaminación de un ovocito es considerable superior comparado con el de los procedimientos estándares de FIV. Por lo tanto, en la manipulación del semen, algunos procedimientos pueden tender a reducir los riesgos mientras que otros pueden parecer incrementar los riesgos de transmisión de enfermedades.

Tanto los virus como las bacterias pueden adherirse a la superficie del espermatozoide o estar asociados con el plasma seminal o glóbulos rojos que se encuentran en una muestra seminal. Por ese motivo, para la obtención de espermatozoides viables y con buena motilidad al momento de realizar la FIV, se suelen usar métodos como la filtración con esferas de vidrio, la filtración con lana de vidrio, los métodos “swim-up”, “fall down”, gradiente de Percoll y la centrifugación en gradiente de albúmina. No obstante, hay que destacar que al implementar antibióticos, tripsina o ácido hialurónico en la centrifugación por gradiente de Percoll modificada y discontinua o el método de “swim-up”, se puede reducir o eliminar la carga seminal de algunas bacterias ubicuas y potencialmente oportunistas (Bielanski, 2006); no obstante, estos procedimientos no demostraron eficacia contra el virus de la DVB en el semen de toros persistentemente infectados, como tampoco el método de “swim-up” elimina el virus de la leucemia bovina (VLB), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), los micoplasmas, *Pseudomonas maltophilia*, *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* del semen antes de la FIV de ovocitos bovinos (Bielanski, 2011).

Interacción de los agentes patógenos con la zona pelúcida

Durante la fecundación *in vivo* y el pasaje de los cigotos tempranos hacia el útero, la ZP acumula glicoproteínas del oviducto de tipo mucinas, de manera gradual en su superficie y en el espacio perivitelino. Por el contrario, en la fecundación *in vitro* los embriones obtenidos no son expuestos a las secreciones oviductales y uterinas, ya que la producción de los mismos incluye varios pasos, como, la obtención de ovocitos, la maduración de dichos ovocitos, para luego fecundarlos y por último, pasarlos a un cultivo; estos pasos se realizan *in vitro* e implementando un incubador que simula el ambiente uterino durante aproximadamente 10 días. Teniendo en cuenta la manera en la que se desarrollan los dos tipos de embriones, se debe cuestionar si la ZP de los

embriones PIV interactúa con los agentes infecciosos de la misma manera que la de los embriones obtenidos *in vivo* y si los embriones PIV pueden transmitir patógenos a las receptoras (Bielanski, 2011).

En bovinos, los agentes infecciosos parece no atravesar la ZP hasta llegar al embrión, pero algunos tienden a adherirse firmemente a la superficie externa de la misma. Por consiguiente, los riesgos asociados con la posible transmisión de patógenos están íntimamente relacionados con las propiedades de la ZP. De esto se deduce que los procedimientos para desinfectar la ZP ocupan un lugar importante dentro de los protocolos de manipulación sanitaria recomendados por la IETS (Van Soom *et al.*, 2011).

La amplia experimentación ha demostrado que la ZP intacta de embriones obtenidos *in vivo* y fecundados *in vitro* es una barrera efectiva contra la penetración de diversos patógenos, aunque algunos virus y bacterias pueden unirse con mayor fuerza a los embriones PIV. Se desconoce el mecanismo de unión de los patógenos a la ZP, pero se ha sugerido que las condiciones divergentes para la producción de esos dos tipos de embriones (*in vitro vs in vivo*) pueden producir cambios en su morfología y diferencias en la interacción de la ZP con los patógenos (Bielanski, 2006).

CATEGORIZACIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE ACUERDO CON EL RIESGO DE TRANSMISIÓN POR LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Basándose en las conclusiones del sub-comité de Investigación del Comité Asesor en Sanidad e Inocuidad (HASAC) de la IETS, las enfermedades y agentes patógenos siguientes se clasifican en cuatro categorías, según la cantidad de investigación que indique la probabilidad de control de las enfermedades mediante el uso de TE. Dichas enfermedades fueron investigadas en 89 posibles patógenos de embriones de la especie bovina (Thibier, 2011).

Categoría 1. Enfermedades o agentes patógenos sobre los que se ha reunido un número suficiente de pruebas que indican que el riesgo de transmisión es insignificante, siempre y cuando se consideren las medidas de bioseguridad para la manipulación de embriones, desinfección de materiales y las exigencias de sanidad animal (para el semen, las donadoras y las receptoras), conforme a lo recomendado en el Manual de la IETS.

Categoría 2. Enfermedades sobre las que se han reunido pruebas sustanciales que indican que el riesgo de transmisión es insignificante siempre que los embriones sean manipulados correctamente entre su recolección y su transferencia, conforme a lo recomendado en el Manual de la IETS, pero que requieren transferencias suplementarias para corroborar los datos existentes.

Categoría 3. Enfermedades o agentes patógenos sobre los que pruebas preliminares indican que el riesgo de transmisión es insignificante, siempre que los embriones sean manipulados correctamente entre su recolección y su transferencia, conforme a lo recomendado en el Manual de la IETS; pero siempre es necesario requerir datos experimentales complementarios *in vitro* e *in vivo* para corroborar los resultados preliminares.

Categoría 4. Enfermedades o agentes patógenos sobre los que se han realizado o están realizando investigaciones que indican que todavía no se pueden sacar conclusiones sobre su nivel de riesgo de transmisión, o bien, que el riesgo de transmisión por transferencia de embriones podría no ser insignificante, aunque los embriones sean manipulados correctamente entre su recolección y su transferencia, conforme a lo recomendado en el Manual de la IETS.

Cuadro 2

Enfermedades o agentes infecciosos en bovinos clasificados por la IETS, de acuerdo con los riesgos de transmisión por los embriones *in vivo* (OIE, 2010)

Categoría	Enfermedades o agentes patógenos
1	Lengua azul, Encefalopatía Espongiforme Bovina, <i>Brucella abortus</i> , Leucosis Bovina Enzootica, Fiebre Aftosa, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina: se requiere obligatoriamente un tratamiento con tripsina
2	No hay la presencia de enfermedades para la especie bovina
3	Virus de Inmunodeficiencia Bovina, Diarrea Viral Bovina, Virus de la Peste Bovina, <i>Campylobacter fetus (subs. veneralis)</i> , <i>Haemophilus somnus</i> , <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> , <i>Neospora caninum</i>
4	Virus de Akabane, Anaplasmosis Bovina, Herpes, Virus Bovino-4, Enterovirus, Dermatitis Nodular Contagiosa, Estomatitis vesicular, Virus de Parainfluenza-3, <i>Chlamydia psittaci</i> , <i>Escherichia coli</i> 09-K99, <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar <i>hardjobovis</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> , <i>Trichomonas foetus</i> , <i>Ureaplasma</i> e <i>Mycoplasma spp.</i>

PAUTAS DE CONTROL DE CALIDAD DENTRO DE UN LABORATORIO

Las medidas de control de calidad afectan a los embriones ya sea de manera directa (higiene del embrión) o indirecta (higiene del laboratorio). El control de calidad y la garantía de calidad en una instalación de producción de embriones son esenciales para reducir la variabilidad asociada con, productos fabricados utilizados en el laboratorio (placas de cultivo, tubos, puntillas entre otros); para optimizar la fidelidad de los procedimientos y para asegurar el manejo adecuado de los materiales de origen animal (como las hormonas y sueros). El objetivo es proporcionar limpieza general, técnicas asépticas y procedimientos consistentes para evitar la contaminación de los embriones de manera directa o indirecta.

Hay que considerar que cada artículo del laboratorio es una potencial fuente de contaminación. Está prohibido comer, beber o fumar en el laboratorio; de la misma manera, deben evitarse las distracciones como llamadas telefónicas y conversaciones, mientras se realizan los procedimientos de manipulación de embriones. La atención a los detalles y la implementación de métodos de procedimiento específicos son necesarios para evitar el error humano, mejorar el desarrollo consistente del embrión y optimizar los resultados. Idealmente, una sala o laboratorio debería ser designado de forma exclusiva para procedimientos de manipulación de embriones, y dentro de esa sala, debería considerarse las siguientes pautas (Mitchel *et al.*, 2001):

- El acceso debería estar limitado solo al personal que labora en dicha unidad de PIV, esto con el propósito de reducir las fuentes de contaminación externas.
- Se debe usar gorro, tapa boca, guantes (sin polvo) y fundas descartables para los zapatos (o cambio de zapatos) para ingresar al laboratorio desde un área ajena del mismo.
- El techo y las paredes del laboratorio deberían estar contruidos de materiales no porosos, y las intersecciones y superficies deberían estar selladas para reducir el polvo y el acceso de plagas.
- Los pesticidas sintéticos biodegradables, no deberían ser utilizados si el laboratorio de FIV esta cultivando embriones.
- Las puertas y las ventanas deberían mantenerse cerradas y selladas, respectivamente, en especial, cuando los embriones están siendo manipulados y las preparaciones están siendo realizadas.
- Las paredes, pisos, ventanas entre otros, deberían ser descontaminados rutinariamente con una solución de hipoclorito de sodio u otro desinfectante, en el momento que los embriones están seguros dentro del incubador. De la misma manera, se recomienda el uso de un 70% de solución de etanol o metanol, 6% de solución de peróxido o una solución desinfectante que sea segura para el embrión, con el fin de limpiar las superficies de trabajo y los utensilios que estarán en contacto directo con los embriones.
- Se recomienda el uso de filtros de aire de alta eficiencia (HEPA) para el sistema de ventilación de calor y aires acondicionados. La filtración por HEPA y la purificación iónica reducirán los contaminantes aéreos no infecciosos pero no reducirá efectivamente muchos de los compuestos gaseosos e inorgánicos.
- Las incubadoras para embriones necesitan atención especial, deberían estar ubicadas en el laboratorio donde haya un mínimo movimiento de aire y tráfico de personal. Los microorganismos crecen en el calor y la humedad de las incubadoras, debiéndose considerar también que otras fuentes de contaminación, incluyen los suministros de gas y agua, aceite mineral liviano y medios de cultivo (Higdon *et al.*, 2007).
- Para reconocer problemas, es necesario definir rangos aceptables de desempeño (por ejemplo: tasas de fecundación, tasas de división embrionaria, tasas de desarrollo de los blastocistos y tasas de preñez), analizar la información de manera continua y mantener un plan estricto de control de calidad, ya que esto ayudaría al diagnóstico temprano de algún problema a nivel de laboratorio.

Resultados consistentemente buenos dependen de la integración de un plan de control de calidad completo dentro de las actividades del laboratorio. Un programa de manejo total de la calidad tiene tres componentes esenciales:

1. **Prevención.** La cual requiere planificación y examen de rutina para asegurar que los suministros sean de la mayor calidad y que el equipo esté funcionando adecuadamente;

2. **Controles internos.** Los cuales, de manera sistemática, evalúan la ejecución de protocolos estándares para asegurar la efectividad y repetición; y
3. **Corrección.** La cual determina las causas de las deficiencias de calidad y restaura los niveles esperados de eficiencia.

CONCLUSIONES

El uso de los embriones se ha comenzado a aceptar ampliamente como un enfoque seguro, eficiente y práctico para el desplazamiento internacional del germoplasma. Sin embargo, ese comercio implica obligaciones éticas significativas para las partes involucradas y requiere de una amplia comprensión de diversas consideraciones prácticas a fin de garantizar una transacción comercial exitosa, sin incurrir en riesgos inaceptables para el estado sanitario de los animales. Para que esto se dé, es necesario aplicar a los embriones PIV las medidas de bioseguridad y biocontención disponibles similares a las que se practican para la manipulación de embriones producidos *in vivo*. De esa forma será posible disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades mediante la transferencia de embriones.

Estas medidas incluyen el control de calidad de complementos de origen animal para los procesos de maduración *in vitro*, FIV y el cultivo *in vitro*, los diferentes lavados de ovocitos y embriones en medios con antibióticos, el análisis de los fluidos de lavado y el cumplimiento de estándares mínimos de sanidad para los laboratorios y los mataderos. Esto sin lugar a dudas, representa un gran desafío en la permanencia en el tiempo y el porvenir venturoso de esta técnica, entre quienes a pesar de la crisis económica que mantiene el país, consideran que la ciencia sigue adelante y que las grandes ideas pueden ser aplicadas de manera idónea y ética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bielanski A, Dubuc C. 1994. *In vitro* fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology* 41: 1211-1217.
- Bielanski A, Dubuc C. 1995. *In vitro* fertilization of ova from cows experimentally infected with a non-cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus. *Anim Reprod Sci* 38: 215-221.
- Bielanski A. 2006. The potencial for animal and human germoplasm contamination through assisted reproductive biotechnologies. *Trends Reprod Biol* 2: 13-36.
- Bielanski A. 2011. Potencial para el control o transmisión de enfermedades mediante embriones producidos *in vitro*: Una revisión. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Editors: David A Stringfellow, M. Daniel Givens. Fourth Edition. Capítulo 3. pp: 46.
- Brackett B, Bousquet M, Boice W, Donawick J, Evans A, Dressel M. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 27: 147-158.
- Dinkins MB, Stallknecht D, Brackett B. 2001. Reduction of infectious epizootic hemorrhagic disease virus associated with *in vitro* produced bovine embryos by non-specific protease. *Anim Reprod Sci* 65: 205-213.

Givens M, Stringfellow D, Riddell K, Galik P, Carson R, Riddell M, Navarre C. 2006. Normal calves produced after transfer of *in vitro* fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Theriogenology* 65: 344-355.

Higdon H, Blackhurst D, Boone B. 2007. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril* 89: 703-710.

Marquant-LeGuienne B, Guyader-Joly C, Ponsart C, Guérin B. 2011. Procedimientos sanitarios generales asociados con la producción *in vitro* de embriones. En: *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Editors David A Stringfellow, M Daniel Givens. Fourth Edition. Capítulo 5: 64.

Mitchel C, Schiewel L, Hasler J. 2011. Prácticas de higiene general y control de calidad en un laboratorio de producción de embriones. En: *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Editors: David A Stringfellow, M Daniel Givens. Fourth Edition. Capítulo 8: 81.

OIE. 2007. Introduction to guidelines for animal welfare in Terrestrial Animal Health Code. OIE, Paris, France. Chapter 3.7.1.

OIE. 2010. Recolección y manipulación de embriones de ganado y équidos recolectados *in vivo*. en *Código Sanitario para los Animales Terrestres*. Capítulo 4.7.14.

Thibier M. 2006. Transfer of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species. *IETS Newsletter* 24:12-18.

Thibier M. 2011. Embryo transfer: a comparative biosecurity in international movements of germplasm. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 30: 177-188.

Van Soom A, Nauwynck H, Wrathall A. 2011. Fundamentos científicos para la seguridad epidemiológica de la transferencia de embriones. En: *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Editors: David A Stringfellow, M Daniel Givens. Fourth Edition. Capítulo 2: 15.