



La "zona pelúcida" del embrión evita el acceso de microorganismos al complejo celular. Muchos agentes patógenos han demostrado ser incapaces de atravesarla.

# La sanidad de los embriones bovinos

Manuel Ortega Martín

Director Técnico. EURO FOMENTO PECUARIO, S.A.

**Y**a hace bastantes años que se consiguió por primera vez la procreación de un ser vivo con la colaboración de procedimientos artificiales, y a pesar de ello aún hoy no podemos hacer más que aportar algunos factores que pensamos indispensables en el momento que creemos preciso, y esperar que todo funcione como ha venido haciendo desde el origen de la vida.

Es grande el desconocimiento que tenemos aún sobre los mecanismos de iniciación de la vida independiente de un nuevo ser, y sobre los recursos que éste posee desde sus primeros instantes para afirmar a su madre, en la que se encuentra involuntariamente alojado, que EXISTE, y que debe continuar su desarrollo hasta valerse por sí mismo.

Existe un diálogo bioquímico perfectamente demostrado y prácticamente desconocido aún para los investigadores, entre una vaca y el embrión que se encuentra en su interior. Se ha comprobado que debe haber una serie de "señales" precisas y sincrónicas del embrión bovino hacia la

madre, para que ésta conozca en primer lugar su existencia, y para que, una vez "de acuerdo" en convivir durante nueve meses, el organismo de la vaca le provea de todos y cada uno de los nutrientes y factores de crecimiento y desarrollo que necesita.

Sin embargo, y a pesar de nuestro desconocimiento del funcionamiento íntimo de la fecundación y gestación, seguimos interviniendo en ellos, con un criterio claramente económico. Hoy en día, la Inseminación Artificial y la Transferencia de Embriones son



La transferencia de embriones ha sido calificada como el método más seguro sanitariamente para el movimiento de genética.

procedimientos habituales en nuestros rebaños, y surge con ellos un "equipaje" de problemas asociados que es conveniente conocer.

**LA CAPACIDAD DIFUSORA DE ENFERMEDADES DEL EMBRION**

Se ha acuñado la idea de que un embrión es una **entidad por sí mismo**, que puede ser definida, desde el punto de vista de la T.E., como un "ovocito fertilizado, resultado de la inseminación de una vaca donante con semen de un sólo toro, y recogido en una sólo extracción". Esta es al menos la definición de que él da la Asociación Americana de Transferencia de Embriones (AETA), con un punto de vista evidentemente parcial y mediatizado por la actividad que esta asociación representa.

Un embrión es un conglomerado de células con una dotación genética idéntica, que responden todas al objetivo común de la "construcción" de un organismo vivo, complejo y altamente especializado.

En el momento en que intervenimos en su desarrollo para extraerlo del útero materno, consta de alrededor de 120 células aparentemente iguales, pero muy cohesionadas y comunicadas entre sí. Ya existe entre ellas, por así decirlo, una organización primitiva que es el origen de la especialización que van a sufrir más tarde las células, en su camino para la formación de órganos y tejidos. Esta fase se denomina "mórula", y su aspecto es el de una bola de células similar a una mora, rodeada de una cubierta no celular, de naturaleza glicoprotéica denominada "zona pelúcida" (ZP).

La zona pelúcida es una eficaz barrera de protección para el embrión, ya que se ha demostrado que no hay

ningún microorganismo patógeno capaz de atravesarla, **siempre y cuando se encuentre intacta.**

En el transcurso de las labores de extracción, manipulación y transferencia de los embriones de una vaca donante a otra receptora, es evidente que existe un riesgo de transmisión de enfermedades contagiosas. Pero analicemos más detalladamente este riesgo.

La transmisión de enfermedades con el embrión presupone la presencia de un agente infeccioso en:

- \* el propio embrión o espacio perivitelino
- \* la zona pelúcida
- \* los líquidos en los que es transferido.

La peor posibilidad es la primera, ya que no existe oportunidad de remoción mecánica (por lavado) de los microorganismos. Por otro lado, la infección del embrión en sí puede haber tenido lugar:

- por vía transovárica (pocas veces se ha demostrado la existencia de patógenos en oocitos)
- a través de la zona pelúcida (cuando existen grietas o fisuras).

El microorganismo infeccioso que nosotros podemos transportar con el embrión ha de haberse puesto en contacto con él en dos momentos:

A. **En la vaca donante** la fase durante la cual el embrión se encuentra en el tracto genital materno antes de ser extraído (7 días) es la más protegida de todo el ciclo de la vaca, ya que durante el reciente estro (celo), ha habido una "limpieza" interna del aparato genital por el aumento de las defensas locales. Hace tiempo que se ha demostrado que los altos niveles de estrógenos circulantes van asociados a infiltración leucocitaria, aumento del aporte sanguíneo, con incremento de la secreción de inmunoglobulinas, y

relajamiento del cérvix con empuje retrógrado del contenido uterino. Esta protección inmunitaria suplementaria suele verse incluso aumentada como consecuencia de los tratamientos de superovulación (existen más folículos productores de estrógenos que en un ciclo normal).

Por otro lado, son pocas las enfermedades cuyos agentes productores se encuentren físicamente en el interior del tracto genital femenino, especialmente si la vaca no muestra síntomas de enfermedad (en cuyo caso habitualmente no se lleva a cabo la extracción de embriones).

Por tanto, las oportunidades para la infección del embrión en los 7 días desde la ovulación hasta la extracción son muy limitadas. Sin embargo, es innegable que la posibilidad existe.

Recientemente han sido publicados los resultados de una investigación (Guérin, Le Guenne, y cols., 1990) sobre la posibilidad de la transmisión transovárica del herpesvirus bovino tipo 1, que demuestran que ésta es posible y probable, pero paralelamente mostraban que los embriones infectados raramente alcanzaban el estadio de dos blastómeros (equivalente a un desarrollo de 1 día). Estos "embriones" jamás serán transferidos a causa de su estado degenerativo el día 7.

B. **Durante la manipulación** desde su obtención hasta la transferencia a una receptora, con o sin congelación intermedia. Es evidente que, aunque se trate de mantener un ambiente de higiene y esterilidad, las condiciones de trabajo en las granjas, casi a pie de vaca, hacen imposible un trabajo cien por cien aséptico.

Para evitar esta contingencia, se emplean materiales estériles, y soluciones asimismo estériles con antibióticos.

El embrión, por su parte, cuenta con unas defensas propias ante la agresión infecciosa: por un lado, la difícilmente penetrable "zona pelúcida" evita el acceso de microorganismos al complejo celular. Muchos agentes patógenos han demostrado ser incapaces de atravesarla siempre y cuando se encuentre íntegra. Entre ellos podemos citar los virus de la Leucosis Bovina, Diarrea Vírica Bovina, y Fiebre Aftosa, además de la bacteria productora de la Bruceosis. Sin embargo, el virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR-IPV)

**TABLA I**

Patógeno	Efectos en el desarrollo	% Embr. portadores
Akabane	No detectados	0
Leucemia	No detectados	0
Lengua Azul	No detectados	0
Diarrea Vírica	No detectados	0
Fiebre Aftosa	No detectados	0
IBR	No detectados	70
Estomatitis Vesicular	No detectados	30
Brucelosis	Descenso Viab.	0

y el de la Estomatitis Vesicular (VSV) se han mostrado capaces de adherirse a la zona pelúcida, aún cuando no la atraviesan.

Además de sus mecanismos de defensa primarios, de naturaleza mecánica, mediante estudios de exposición *in vitro* de embriones desnudos de ZP frente a los virus de Leucosis, Diarrea Vírica, Parvovirus y frente a *Brucella abortus*, se ha llegado a la **sospecha** de que el blastocisto posee una cierta resistencia ante las infecciones por determinados agentes patógenos.

Como regla general, se puede afirmar que los embriones más capacitados para resistir la infección o adherencia de agentes patógenos son los que poseen ZP simétricas, de anchura uniforme, sin materiales adheridos, y con pocas células extruidas.

Otro punto a tener en cuenta es el que en caso de que el agente infeccioso llegue a ingresar en el espacio perivitelino, normalmente se produce un daño acusado en el desarrollo embrionario, que no es capaz de sobrepasar los bloqueos de 1-2 células y de 8 células. Con todo ello, cuando es extraído de la vaca, su morfología aparenta la de un embrión retrasado o degenerado, por lo que no es transferido.

## MEDIOS DE PREVENCIÓN

Dado que el peligro real de transmisión de enfermedades se restringe a la vehiculación mecánica de los agentes productores, bien adheridos a la zona pelúcida, o bien incluidos en cúmulos celulares o restos de mucus, es de máxima importancia manipular los embriones de acuerdo con unos procedimientos efectivos, como los aprobados por la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones, la Oficina Internacional de Epizootias, y la Asociación Americana de Transferencia de Embriones, exigidas por las autoridades sanitarias de la CE a efectos de movimiento internacional de embriones. Estos procedimientos se encuentran recogidos en el capítulo III del Manual de la IETS.

Combinan cuatro principios:

1. Factor de dilución
2. Lavado mecánico
3. Acción de agentes antimicrobianos
4. Tratamientos enzimáticos.

Los embriones han de ser observados a grandes aumentos, y eliminadas todas

las partículas y restos de materiales (mucus, conglomerados celulares, etc.) adheridos a la ZP.

Posteriormente han de ser sometidos a **diez** lavados (factor mecánico) en medio estéril con antibióticos (acción antimicrobiana), empleando para el trasiego pipetas o pajuelas estériles, y pasando una pequeña cantidad de medio (lo ideal son 10-20  $\mu$ l) de uno a otro paso (factor de dilución).

Las pipetas deben ser cambiadas tras cada lavado, y los embriones agitados suavemente, evitando aspirar restos celulares o mucus al siguiente lavado.

De esta manera se consiguen los tres primeros efectos del proceso. Para lograr el cuarto se someten los embriones a la acción de la tripsina (al 0,25% en solución de Hank's sin Ca ni Mg, ni proteínas séricas), en dos baños intercalados en los diez simples. Los embriones han de permanecer en cada baño de tripsina un máximo de 30 segundos, ya que sus efectos sobre la viabilidad ulterior no han sido plenamente demostrados.

En estudios realizados para determinar la capacidad de transmisión de enfermedades de los embriones, en los cuales se sometían éstos a la acción de dosis muy elevadas de agentes infecciosos (Singh & Thomas, 1982-1987), y posteriormente a diez lavados seriados con antibióticos (sin tripsina), se observaron los siguientes resultados: (Tabla I)

Por eso se hace patente la necesidad del empleo de tripsina para evitar la difusión de los virus de IBR y Estomatitis Vesicular. Así se hizo en otro trabajo por ma misma autora, y se comprobó que tras la acción de la tripsina al 0,25% durante 60-90 segundos, ninguno de los embriones sometidos a la acción de IBR o Estomatitis Vesicular era portador del virus.

Por otro lado, en estudios serológicos de la descendencia obtenida por T.E. a partir de donantes seropositivos o infectadas con virus de Leucemia, Lengua Azul, Fiebre Aftosa e IBR (Singh y Mebus), ninguna de las crías fue encontrada seropositiva, y lo mismo puede decirse de las receptoras empleadas. Únicamente se puede asegurar que la combinación de 10 lavados y tripsinización será efectiva en el caso de que la zona pelúcida se encuentre intacta, ya que en caso contrario los virus se replican en las células embrionarias, donde no pueden ser inactivados.

## CONCLUSION

La transferencia de embriones ha sido calificada recientemente, en la Sesión Informativa de la IETS sobre Movimiento Internacional de Embriones (Winegar, Singh, Marchant, Enero 1991), como el método más seguro, sanitariamente hablando, para el movimiento de genética.

Sin embargo, aunque esté demostrado que las posibilidades de que un embrión sea portador de una enfermedad infecciosa son mínimas, esto sólo es cierto en los casos en que los embriones son manipulados de acuerdo con unos procedimientos sanitarios básicos.

De la aplicación correcta y puntual de estos procedimientos son directamente responsables los equipos de transferencia de embriones, y se ha demostrado que son los equipos teóricamente mejor preparados los que conocen y aplican los sistemas recomendados. La Oficina Internacional de Epizootias, en su 5.<sup>a</sup> edición del Apéndice 5.2.3.1 (28 de mayo de 1985), recomienda el control sanitario de:

- \* equipo de recolección
- \* laboratorio de procesamiento
- \* productos biológicos empleados
- \* esterilidad del material, presencia de antibióticos en los medios químicos.
- \* estado clínico de la donante y su rebaño (no se requiere inspección serológica).

## BIBLIOGRAFIA

- SINGH, E.L. "The disease control potential of embryos". Theriogenology, 1987.
- SINGH, E.L., EAGLESOME, M.D., THOMAS, F.C. "Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections: I The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to akabane, bluetongue and BVD". Theriogenology, 17 (1982).
- GUERIN, B., LE GUENNE, B., HARLAY, T., etc. "Contamination des oocytes et des embryons fécondés *in vitro* après infection expérimentale de vaches donneses par le virus bovin Herpes de type 1 (BHV1)". Rec. Méd. Vét. (165), 1989.
- CARMICHAEL, R.A. "Designated Pathogen Free Embryos". Holstein Science Report, 1987.
- EISEN, R.P., SEIDEL, JR., G.E. "Embryo Transfer prevents disease transmission". Hoard's Dairyman, 1989.
- EISEN, R.P., SEIDEL, JR., G.E. "Curiosity fuels embryo research". Hoard's Dairyman, 1989.
- EISEN, R.P., SEIDEL, JR., G.E. "There's much involved when exporting embryos". Hoard's Dairyman, 1987.