

# Manual de FERTILIZACIÓN IN VITRO EN BOVINOS

Yael Filipiak y Clara Larocca



Universidad de la República  
Facultad de Veterinaria  
Área de Biotecnología de la Reproducción

# FERTILIZACIÓN IN VITRO EN BOVINOS

---

## INTRODUCCIÓN

El término Fecundación In Vitro (FIV), implica que esta se realiza en un laboratorio, ella involucra el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femeninos y masculinos en un ambiente artificial con el fin de producir embriones.

El objetivo de este manual es proporcionar técnicas básicas de la FIV y su aplicación en el bovino.

Han pasado más de 100 años que Hermann Fol, un Zoólogo suizo, observó por primera vez un espermatozoide penetrando a un ovum de estrella de mar y la formación de la primera célula del futuro embrión (Del Campo MR y col, 1994). Las primeras investigaciones se hicieron en especies de invertebrados marinos. La razón de esto, es que la fecundación ocurre afuera de la hembra (en agua de mar), al contrario de los mamíferos, en los que ocurre dentro del organismo.

Desde 1950, las técnicas de FIV han sido desarrolladas y perfeccionadas de tal forma que el cultivo, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano se lleva a efecto in vitro. Esto ha permitido estudiar y entender en mejor forma las interacciones ovum-espermatozoide en los animales mamíferos (Iritani A y Niwa K, 1997; Benau DA y Storey BT, 1988).

Han trabajado con éxito entre otros, los laboratorios de los Drs. T. Greve y P. Hyttel en Dinamarca, Dr. A. Hanada en Japón, Dr. O. Ginther, Dr. N. First y Dr. J. Parrish en USA, Dr. R. Mapletoft en Canadá y Dr. C. Barros en Chile (Del Campo MR, 2001)

La primera cría nacida por FIV fue reportada en el conejo en 1959 (Barros B y col) y en 1968 en ratón de laboratorio (Del Campo MR, 1990). En 1977, se obtuvo el primer bovino por FIV, con semen capacitado en el oviducto de la vaca o útero de la coneja (McKinnon AO y col, 1992). El primer ternero resultado de un ovocito madurado y fecundado in vitro nació en 1986 después que el embrión fue cultivado en el oviducto de una oveja por 5 días (Del Campo MR, 1995). Sin embargo, los primeros terneros nacidos de ovocitos madurados in vitro, fecundados in vitro y cultivados (desarrollo temprano) in vitro se reportó en 1987 (Kruip AM, Dieleman SJ, 1982). Un año más tarde en Latinoamérica, se produjo en Uruguay, el primer nacimiento de dos terneros obtenidos de FIV, en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, dirigido por la Dra Clara Larocca, apoyado por JICA, Japón (*Ver Foto 1*).





*Foto 1: Primeros terneros nacidos por FIV en Uruguay*

## **TECNICA Y METODOLOGIA DE LA FECUNDACION IN VITRO EN EL BOVINO**

La FIV en el bovino, se efectúa en varias etapas, ellas comprenden:

- 1) Recuperación y clasificación de los complejos cúmulus ovocitos (COC) obtenidos de los ovarios, ya sea de especímenes colectados en el matadero o recuperados de hembras vivas.
- 2) Maduración de los COC
- 3) Fertilización
- 4) Cultivo de desarrollo de los cigotos

Los embriones así producidos pueden ser transferidos inmediatamente a receptoras, congelados o destinados a la investigación.

Hay que distinguir que en la técnica de FIV desarrollada rutinariamente en los laboratorios de investigación se usan ovarios (para la recuperación de ovocitos) de hembras que han sido faenadas en el matadero, que no tienen prácticamente ningún valor genético.

Por supuesto, en programas reproductivos, los embriones producidos in vitro provienen de hembras de alto valor genético.

Otra técnica que se ha desarrollado en los últimos años es la obtención de ovocitos por punción de los ovarios in vivo (OPU, ovum pick up)



## CULTIVO Y MEDIOS

En la producción in vitro de embriones, los elementos constitutivos de los medios, son de importancia capital.

El mayor componente de los medios de cultivo es el agua, conteniendo también iones inorgánicos (con funciones catalíticas y fisiológicas) (Palasz AT y col, 2000); aminoácidos, implicados en la síntesis proteica y vitaminas, que juegan un papel importante como coenzimas en el metabolismo (Lehninger AL, 1975).

Diversos autores han estudiado el efecto de la adición de hormonas, tales como LH, FSH y  $17\beta$  estradiol, en los medios de maduración y desarrollo. Como alternativa, se pueden emplear suero de vaca en celo (SVC) y/o licor folicular bovino (LFb), componentes biológicos, más económicos (Larocca y col; 1993; 1997). Se ha estudiado el efecto de adicionar LFb a diferentes concentraciones y proveniente de diferentes fuentes al medio de maduración y/o de desarrollo, encontrándose efectos positivos (Larocca y col, 2004). El LFb contiene esteroides, glucosaminoglicanos y muchos otros metabolitos sintetizados por las células de la teca folicular (Romero y Sidel, 1994; Sirard y col, 1995).

Una forma de suplementar proteínas a los embriones in vitro es mediante la adición al medio de suero fetal bovino (SFb) o de albúmina de suero bovino (BSA). (Palasz AT y col, 2000). El SFb y la BSA afectan al pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la diferenciación y proliferación celular (Ball y col, 1985).

Los medios de cultivo suelen ser complementados de forma estandarizada con antibióticos para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminantes.

Otros requerimientos de cultivo son la temperatura, el pH, dióxido de carbono y tensión de oxígeno, osmolaridad y humedad relativa.

La osmolaridad óptima en medios de cultivo de embriones bovinos está en el rango de 275 a 285 mOsm. (Gordon, 1994).

El pH del medio de cultivo debe estar entre 7,2 y 7,4, mientras que en los medios de fecundación, se recomienda ligeramente superior (7,6-7,8) (Palasz AT y col, 2000).

Las condiciones habituales de las distintas etapas de cultivo de embriones son 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El dióxido de carbono resulta necesario para la regulación del pH intracelular (Carner y Bavister, 1986).

La temperatura de cultivo utilizada en general por los investigadores es de 38,5°C con 100% de humedad.



## RECUPERACION DE LOS COMPLEJOS CUMULUS-OVOCITOS (COC)

Existen diferentes técnicas de recuperación de COCs según se trate de material de matadero o de hembras vivas.

### De hembras vivas:

OPU. Aspiración con agujas especiales y bomba de vacío, guiada por ultrasonografía. Las técnicas de recuperación in vivo se han desarrollado ultimamente y no obstante la "calidad" de los COCs recuperados de folículos de tamaño mediano y grande (>5 mm) es muy buena. El número que se recupera es bastante menor que el que se obtiene de los ovarios de frigorífico. (Critser, ES y col, 1986)

### De material de matadero:

Los ovarios, colectados de hembras faenadas son transportados en termos que contienen suero isotónico a 35-37 °C. La aspiración de los COCs, se realiza aproximadamente dentro de 4 a 6 horas después de faenados los animales.

Todos los folículos que no presentan indicios de atresia folicular, entre 2 y 8 mm de diámetro, son aspirados (Parrish JJ y col, 1986; Bielanski A y col, 1993). También se puede utilizar una pequeña maquina de aspiración. La recuperación es moderada y la "calidad" (capacidad de los ovocitos de completar la meiosis) es "buena", en comparación con la técnica de desmenuzamiento (con una hoja de afeitar, se corta la superficie del ovario) en la cual la recuperación es alta, pero la calidad de los ovocitos es baja. Esto se debe más que nada a que se recuperan ovocitos de folículos muy pequeños no antrales que no han alcanzado el tamaño adecuado para ser madurados in vitro (Brogliatti GM y col, 1995).

## Clasificación y evaluación de los COCs

Los COCs se categorizan de acuerdo a la morfología de las células del cumulus oophorus y a las características del ovoplasma (*Cuadro 1*):

*Cuadro 1:*

<b>Clasificación de los COCs:</b>		
<b>Clasificación</b>	<b>Calidad</b>	<b>Características a evaluar</b>
<b>A</b>	Bueno	Completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo
<b>B</b>	Regular	Rodeado parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.
<b>C</b>	Malo	Desnudo.
<b>D</b>	Degenerado	Rodeado por fibrina (con aspecto de tela de araña)

(Liebfried L and First N L, 1979; Sato E y col, 1990)



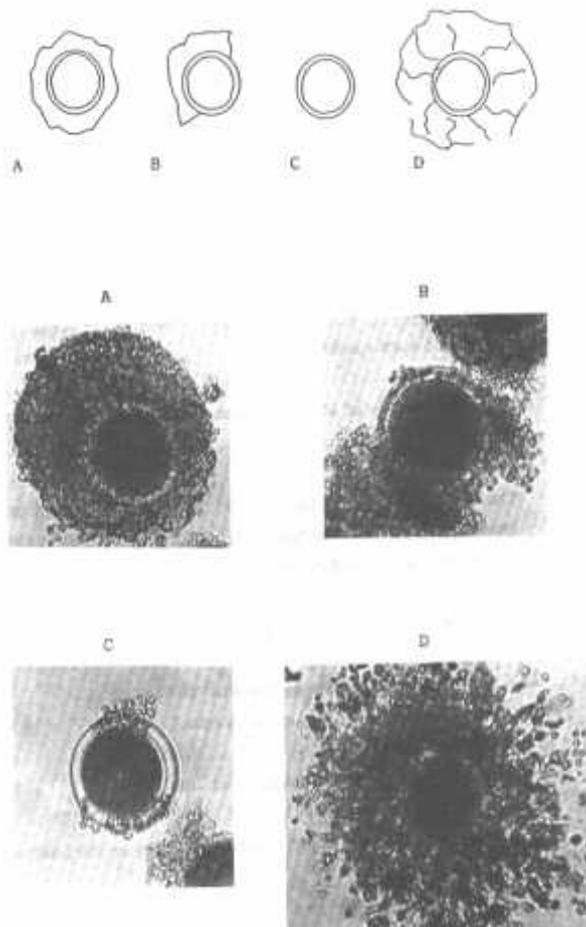


Foto 2: COCs de calidad A y B

Es bastante difícil seguir una regla fija en lo que se refiere a la clasificación morfológica bajo un microscopio estereoscópico, ya que por un lado, hay una gran variabilidad entre los COCs y por otro, la cantidad de COCs que un técnico debe manipular hace difícil categorizarlos adecuadamente. En el cuadro 2 se muestra un esquema de las diferentes categorías de COCs.

Cuadro 2:

Esquema de Clasificación de los COCs



## Metodología de trabajo

### Primer día (se reciben los ovarios)

Preparar las soluciones de trabajo (entre 3 y 12 horas antes):

Medio de aspiración de ovocitos (m-PBS, 50 ml) (Norio S, 1994).

Medio de maduración (M-TCM-199, 20 ml) (Norio S, 1994).

Medio de desarrollo (CR1aa, 50 ml) o (D-TCM-199, 10 ml) (Norio S, 1994).

Lavar, hacer la asepsia y encender la estufa (38°C; 5% CO<sub>2</sub>). En el interior se colocará el M-TCM-199, y el aceite mineral para que se equilibren.

Las soluciones stock se preparan como se explica en el anexo a partir de la *pág. 16*

El aceite mineral se coloca en la estufa con 5% de CO<sub>2</sub> en aire, para se equilibre en temperatura y el pH (por lo menos 3 horas antes de su uso)

### **Metodología para la obtención y clasificación de COCs (complejo ovocito cúmulus)**

El laboratorio debe estar aséptico y con los equipos preparados, previamente al ingreso del material de trabajo. Se limpia y desinfectan las superficies de trabajo con alcohol 70° y se verifica que estén todos los materiales necesarios.

Se preparan los medios, el baño maría con los elementos y se colocan en estufa para que se templen y equilibren.

1º) Se lavan los ovarios en un colador con sol de NaCl isotónico a 38°C

2º) Se colocan en vaso de bohemia al baño María (38°C), con sol isotónica

3º) Se seca con gasa estéril la superficie del ovario

4º) Se carga una jeringa con 1 ml de m-PBS (medio de aspiración)

5º) Se aspiran todos los folículos de 2 a 8 mm de diámetro (No aspirar folículos de más de 8 mm de diámetro).

6º) Cuando el líquido llena la jeringa, se transfiere suavemente a cajas de Petri de 90 mm con fondo cuadrado, sobre la platina caliente.

7º) Se Prepara una placa de Petri pequeña con medio m-PBS para colocar los COC obtenidos y seleccionarlos bajo microscopio estereoscópico.

8º) Se colectan los COCs con una pipeta Pasteur de diámetro adecuado, clasificándolos según calidad (A, B, C, D) y seleccionar los de calidad A o los A y B, según el criterio del experimento.





*Foto 3: Ovarios de Vaca*



*Fotos 4 - 6: Recuperación de ovocitos*



*Foto 7: Búsqueda bajo microscopio estereoscópico*

Los COCs seleccionados, se lavan dos o tres veces en cajas de Petri pequeñas con medio m-PBS.

Se utilizan diferentes medios para el cultivo de desarrollo. Los más utilizados son el CR1aa y el TCM-199.

En caso de que el cultivo de desarrollo se realice en medio TCM-199, será necesario realizar cocultivo con células de la granulosa. En una caja de Petri se coloca medio de cultivo M-TCM-199 cubierto con aceite mineral y se cultivan células de la granulosa en estufa 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se preparan las cajas de Petri para la maduración y se colocan en estufa a 38°C y 5% de CO<sub>2</sub> como se explica en la etapa siguiente de maduración in vitro.



## MADURACIÓN IN VITRO

La maduración del ovocito in vitro que incluye la maduración nuclear y citoplasmática fue reportada en 1965 en diferentes especies (Del Campo y col, 1995; Hinrichs K, 1993).

La meiosis permanece detenida en los ovocitos que se encuentran en los folículos hasta que estos son expuestos a gonadotrofinas que permiten su continuación. La meiosis in vivo es detenida por sustancias foliculares que aún no están bien definidas. Sin embargo, los COCs que son removidos desde los folículos, comienzan la meiosis espontáneamente (*Cuadro 3*).

En el proceso de maduración in vivo de los ovocitos, intervienen la hormona folículo estimulante (FSH) en el crecimiento folicular, la hormona luteinizante (LH), que induce la maduración final y la ovulación del ovocito seleccionado (12, 38, 44). Varios autores han indicado que para que el proceso de maduración se lleve a cabo debe existir un balance hormonal en el folículo (particularmente de los esteroides) (25). En un sistema in vitro, este balance natural es imitado agregando las hormonas FSH, LH y estradiol 17 $\beta$  al medio de maduración (TCM-199). En algunos laboratorios la adición directa de estas hormonas ha sido substituida agregando suero de vacas en celo (SVC) y licor folicular bovino (LFb). Estos componentes biológicos son suficientes para producir maduración (nuclear y citoplasmática), expansión de las células del cúmulus y futuro desarrollo del cigoto.

*Cuadro 3:*

<b>Maduración de los COCs:</b>	
<b>Estructura</b>	<b>Tiempo de maduración in vitro de COC bovinos (hs)</b>
Vesícula germinativa (GV)	0.0-6.6
Ruptura de la membrana de la GV	6.6-8.0
Condensación de la cromatina	8.0-10.3
Metafase I	10.3-15.4
Anafase I	15.4-16.6
Telofase I	16.6-18.0
<b>Metafase II</b>	<b>18.0-24.0</b>

Adaptado de Sirard, MA y col, 1989 y Sato E y col, 1990.

### Metodología para la Maduración

Los ovocitos se lavan dos o tres veces en gotas grandes de 300  $\mu$ l o en cajas de Petri pequeñas con M-TCM-199 y se transfieren a las cajas de Petri con gotas de maduración (M-TCM-199) cubiertas con aceite mineral (previamente equilibrado en estufa).



Según la cantidad de COCs o de grupos de COCs se determinará el método a utilizar para la maduración:

- En el método de una gota, se transfieren 60 COCs juntos a una sola gota de 600  $\mu$ l.
- En el método de gotas múltiples, según la cantidad de grupos, se transfieren a gotas de 100  $\mu$ l, grupos de 10 COCs o grupos de 20-25 COCs se colocan en gotas de 200  $\mu$ l

El rango de COCs a madurar es de unos 10 ovocitos por cada 100  $\mu$ l de medio M-TCM-199.

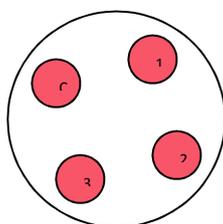
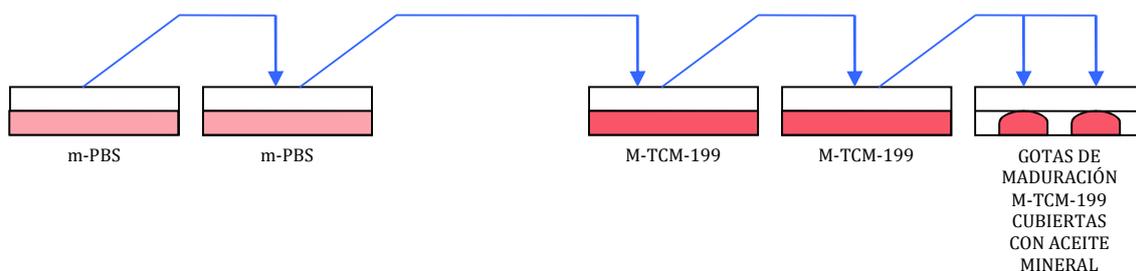
Para la maduración se preparan cajas de Petri numeradas en la parte inferior para identificar los grupos de ovocitos manteniéndolos siempre en gotas separadas.



Foto 8: Gotas de Maduración en 3 gotas de 100  $\mu$ l

Cuadro 4:

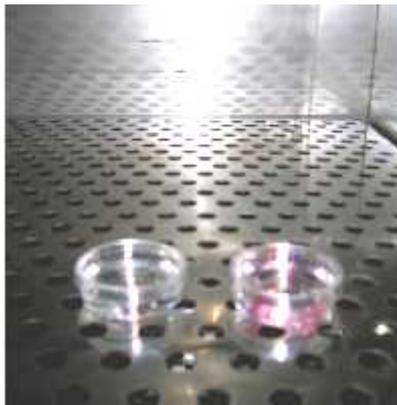
Esquema de lavado y maduración de los COCs:



Caja de Petri numerada con gotas de maduración, cubiertas con aceite mineral (4 gotas de 100  $\mu$ )



Las cajas de Petri preparadas con las gotas de maduración y los ovocitos, cubiertas con aceite mineral, se colocan en estufa a 38°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 22 hs.

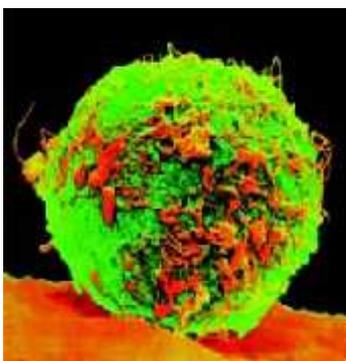


*Foto 9: Cajas de maduración en la estufa incubando en la estufa*

Una vez puestos a madurar los ovocitos, el día anterior a la fertilización, componemos las soluciones de BO lavado de semen, BO lavado de ovocitos y BO dilución de semen. Se explica en el anexo.

## FERTILIZACIÓN IN VITRO O INSEMINACIÓN

Para que tenga lugar la fertilización del ovocito, los espermatozoides deben ser previamente capacitados. La capacitación espermática es la reacción donde son retiradas las glucoproteínas de la membrana del espermatozoide y que le permiten adquirir su capacidad para poder fecundar al ovocito. In vivo, la capacitación del espermatozoide ocurre durante su pasaje por los órganos reproductores de la hembra. Durante la capacitación ocurren varios fenómenos: los espermatozoides adquieren hipermotilidad progresiva, la capacidad de penetrar el cumulus y se preparan para que tenga lugar la reacción acrosómica.



*Foto 10: Ovocito siendo fecundado por espermatozoides*



*Fotos 11 y 12: Ovocitos penetrados por un espermatozoide*



Una vez madurados los COCs, se lavan y se colocan en gotas de inseminación que contengan la concentración de espermatozoides por ml. deseada. La relación es de 10 COCs / 100 µl de medio de fecundación.

El medio que utilizamos para inseminar se conoce como medio Brackett and Oliphant (Brackett BG y Oliphant G, 1975), el cual contiene heparina y cafeína que son necesarias para la capacitación espermática.

## Metodología de inseminación

### Preparación de los COCs

Antes de comenzar con la inseminación, se preparan los COCs.

Los ovocitos se lavan en solución BO de lavado de ovocitos 2 ó 3 veces y se dejan en gotas de BO en estufa (a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>), mientras se realiza la manipulación del semen. (La preparación de la solución BO se explica en el anexo).

En caso de que vayamos a utilizar el medio TCM-199, es necesario realizar cocultivo con células de la granulosa, presentes durante la maduración. En ese caso, guardamos la caja con las gotas de M-TCM-199 nuevamente en la incubadora para que las células del cúmulus que hayan quedado se sigan desarrollando. En esta etapa hay que tener especial precaución para que no ocurra contaminación del medio de cultivo.

Si se utiliza el medio CR1aa, no es necesario el cocultivo.

### Preparación del semen

#### Con gradiente de Percoll:

1º) Se coloca en la platina caliente (35°C) un tubo cónico de centrífuga y portaobjetos estériles para que se templen.

2º) Se coloca en un tubo cónico de centrífuga 1 ml de solución Percoll al 90% (diluída en solución BO de lavado de semen), luego, suavemente se agrega 1 ml de solución Percoll al 45% sobre la solución anterior.

3º) Se saca la pajuela de semen del termo de nitrógeno, se mantiene a temperatura ambiente durante 10 segundos y se coloca en Baño María a 35°C por 30 seg. Se seca con gasa mojada en alcohol.

4º) Se corta el tapón con tijera, se invierte sobre el tubo de centrífuga preparado con el gradiente de Percoll y se corta el otro extremo, se deposita el semen suavemente sobre el Percoll.

5º) Se toca con una gota de la pajuela un portaobjetos caliente.

6º) Se centrifuga el tubo con el semen y el Percoll a 500 G (1.800 rpm, dependiendo del radio de la centrífuga) durante 15 minutos (equilibrar la centrífuga con otro tubo que contenga la misma cantidad de agua).

Mientras tanto, observar al microscopio el portaobjetos con el semen para evaluar su calidad según su vitalidad, motilidad y concentración (400x).



7º) Se toma el tubo de la centrífuga y se aspira el líquido sobrenadante, el pellet que queda en el fondo del tubo se diluye en 5 ml de medio de lavado de semen y se repite el procedimiento centrifugando nuevamente a 500 G por 5 minutos.

8º) Se toma el tubo de la centrífuga, se vuelve a aspirar el líquido sobrenadante, se calcula la concentración espermática del pellet que queda en el fondo del tubo y se diluye enrazando al volumen final (como se aclara en el cuadro 5 con medio de dilución de semen).

### Con medio BO:

1º) Se coloca en la platina caliente (35°C) un tubo cónico de centrífuga y portaobjetos estériles para que se templen.

2º) Se saca la pajuela del termo de nitrógeno, se mantiene a temperatura ambiente durante 10 segundos y se coloca en Baño María a 35°C por 30 seg.

3º) Se seca con gasa mojada en alcohol.

4º) Se corta el tapón con tijera, se invierte sobre el tubo de centrífuga inclinado y se corta el otro extremo, el semen baja por la pared del tubo. Se pone el tubo en Baño María a 35°C.

5º) Se toca con una gota de la pajuela un portaobjetos caliente.

6º) Al tubo con semen, se le agregan 6 ml de medio de lavado de semen y se centrifuga a 500 G (1.800 rpm, dependiendo del radio de la centrífuga) durante 5 minutos (equilibrar la centrífuga con otro tubo que contenga la misma cantidad de agua).

Mientras tanto, observar al microscopio el portaobjetos con el semen para evaluar su calidad según su vitalidad, motilidad y concentración (400x).



Foto 13: Tubo con semen en BO de dilución luego de centrifugado.  
Se aprecia el pellet en el extremo cónico del tubo

7º) Se toma el tubo de la centrífuga y se aspira el líquido sobrenadante, el pellet que queda en el fondo del tubo se diluye nuevamente en 6 ml de medio de lavado de semen y se repite el procedimiento centrifugando nuevamente a 500 G por 5 minutos.

8º) Se toma el tubo de la centrífuga, se vuelve a aspirar el líquido sobrenadante, el pellet que queda en el fondo del tubo se diluye enrazando al volumen final (como se aclara en el cuadro 5 con medio de dilución de semen).



Cuadro 5:

Cálculo de dilución:

Se averigua la concentración de espermatozoides que contiene la pajuela para calcular la dilución necesaria para la concentración deseada.

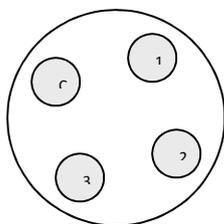
Aplicamos la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Vol } i \times [i]}{[f]} = \text{Vol } f$$

### Inseminación:

Se prepara una caja de Petri y con el semen ya capacitado y diluido a la concentración deseada, se preparan gotas para la inseminación, cubiertas con aceite mineral.

Se sacan los ovocitos del medio BO, que estaban en la estufa y se colocan por grupos en las gotas de semen, en una proporción de 10 ovocitos en 100 µl aproximadamente.



Caja de petri numerada con gotas de semen, cubiertas con aceite mineral (4 gotas de 100 µ)

Se coloca la caja con los ovocitos y el semen en la estufa a incubar por 5 hs (método japonés) (Norio S, 1994) o 24 hs (Uruguay y Argentina) (Cabbio, 2006).

Después de la inseminación, preparamos el medio de desarrollo, que consiste en CR1aa (o TCM-199) adicionado, como se explica:

Se coloca en estufa el aceite mineral, con 5% de CO<sub>2</sub>, para se equilibre la temperatura y el pH.

### DESARROLLO IN VITRO:

Una vez finalizada la etapa de inseminación, se remueven los cúmulos de los ovocitos y se lavan en el medio seleccionado para el cultivo (CR1aa), luego se incluyen en gotas con este medio, cubiertas de aceite mineral y se colocan en la estufa.

Para realizar la remoción de los cúmulos se forma una gota de 300 µl del medio TCM-199 con Hepes suplementado con 5% de SFb, en una caja pequeña y se pipetea 40 veces con micropipeta automática de 100 µl.



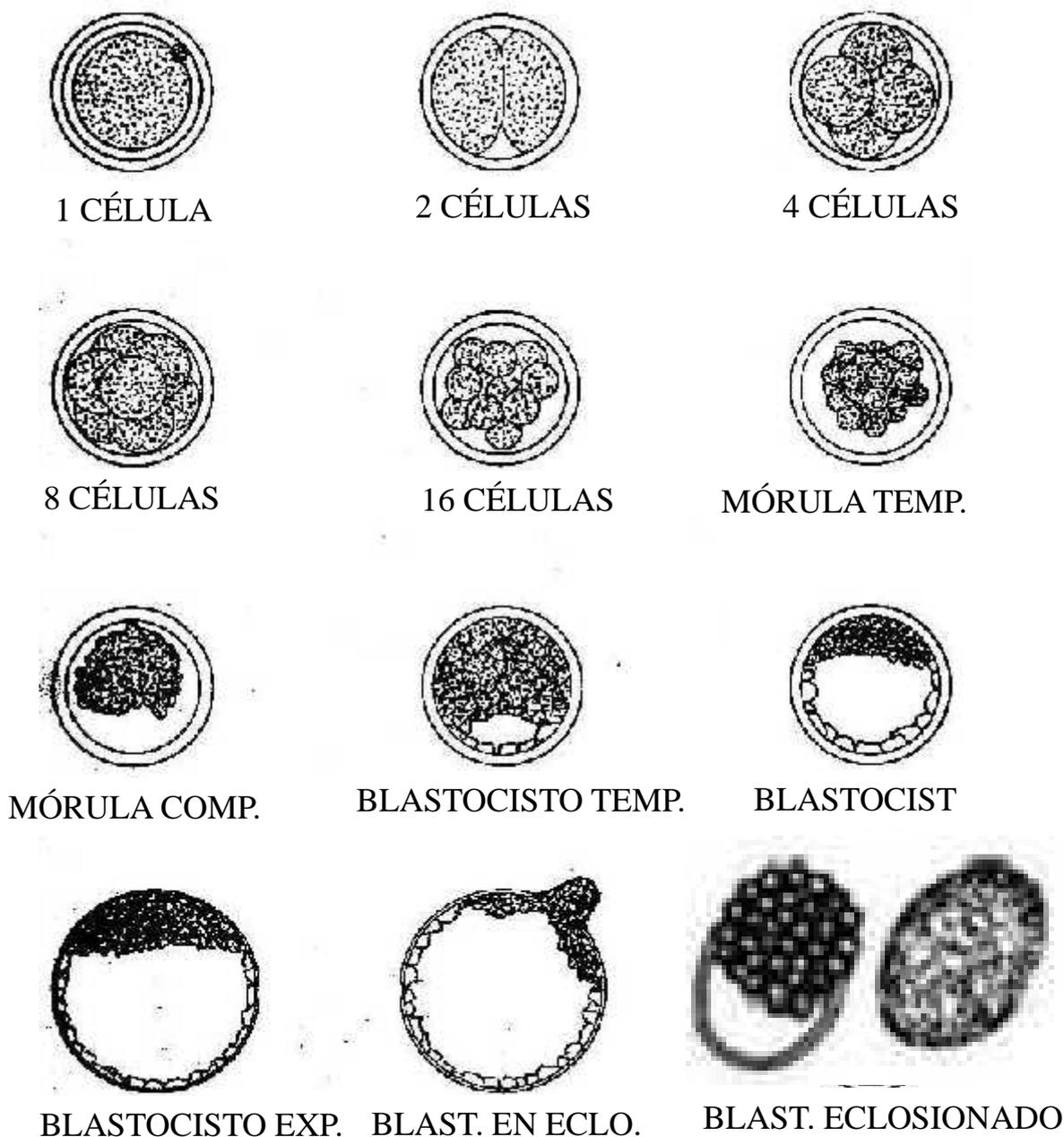
Luego se lavan los ovocitos en el medio CR1aa dos veces y se pasan a las gotas de cultivo.

Se coloca la caja de Petri en la incubadora a 38°C, con 5% CO<sub>2</sub>.

A las 48 a 72 horas se realiza la primera evaluación de división celular. Posteriormente cada 48 horas hasta los días 9-10 en los cuales los ovocitos fecundados deben encontrarse en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido.

Cuadro 6:

Clasificación de embriones según su desarrollo:



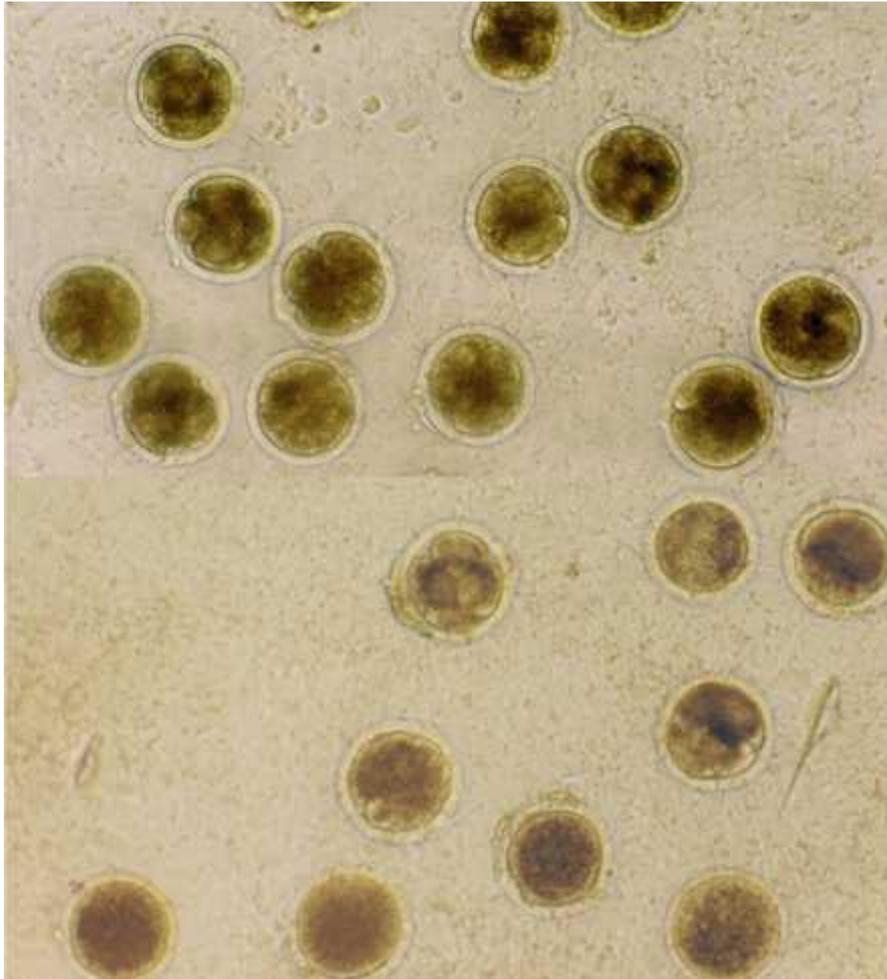


Foto 14: Embriones en desarrollo a las 48-72 horas



Foto 15: Embrión de 2 células

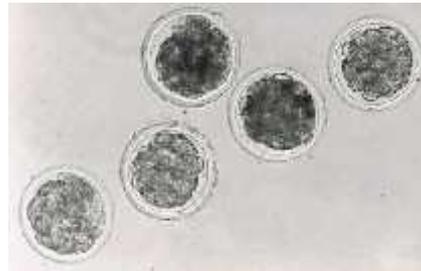


Foto 16: Mórulas compactas

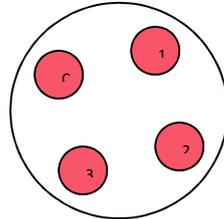


Foto 17: Blastocistos y blastocistos eclosionando



## Desarrollo in vitro utilizando TCM como medio de desarrollo:

Al retirar los ovocitos de las gotas de inseminación, una vez equilibradas las soluciones, se forman gotas de cultivo y se colocan los ovocitos de acuerdo a los grupos en las gotas correspondientes y células del cúmulus de manera alternada con los ovocitos.



Caja de petri numerada con los ovocitos fertilizados y células de la granulosa, en gotas de M-TCM-199, cubiertas con aceite mineral (4 gotas de 100  $\mu$ )

Otra forma en que se puede proceder es conservando la caja de petri en la que hicimos la maduración, como se propuso en esa etapa, la cual tiene algunas células del cúmulus que han quedado al retirar los ovocitos. Si optamos por este método, debemos cambiar el medio de las gotas para renovarlo con medio nuevo, pero usando la misma caja de Petri. Siempre cuidando que no se produzca contaminación.

Las células de la granulosa crecen y se extienden sobre la superficie del fondo de la gota como una red.

Cada 48 horas se chequea para evaluar desarrollo de los embriones y se realizan cambios parciales del medio de cultivo.



# ANEXO

## Preparación de las soluciones stock

Las soluciones stock servirán para componer los medios para las respectivas etapas.

Las soluciones a preparar son:

SOLUCIONES STOCK	MEDIOS DE CULTIVO
PBS (+) (Buffer Fosfato Salino)	m-PBS – Medio de aspiración y lavado de ovocitos
TCM-199 (medio de maduración con sales de Earl)	M-TCM-199 – Medio de maduración D-TCM-199 – Medio de desarrollo
BO Stock (Soluciones A y B) (Brackett and Oliphant)	BO de lavado de semen BO de lavado de ovocitos BO de dilución de semen
CR1aa (Soluciones A y B)	CR1aa – Medio de desarrollo

### D-PBS (Solución Stock)

Se describe la preparación de 1 litro de solución en base los sobres Nissui Co Ltd, que vienen listos para constituir las soluciones. En caso de preparar la mitad (500 ml) utilizar la mitad de todos los reactivos.

1º) Disolver el sobre A (PBS (-), piruvato de sodio y glucosa en 800 ml (o 400 ml) de agua ultra pura.

	<i>Para 1 ltr</i>	<i>para 500 ml</i>
PBS (-) (sobre A, Nissui Co Ltd)	10,6 g	5,3 g
Agua BD, aforar a	800 ml	400 ml

2º) Aparte disolver el sobre B de sales metálicas (CaCl<sub>2</sub>) en agua bidestilada.

Sales metálicas, CaCl <sub>2</sub> (sobre B)	0,1 g	0,05 g
Agua BD, aforar a	200 ml	100 ml

3º) Mezclar ambas soluciones.

4º) Filtrar con filtros 0.22 µ

Conservar refrigerado (4 – 5 °C) por 30 a 45 días.



**PBS Buffer**

Para preparar la solución a partir de los reactivos (en caso de no haber sobres de PBS).

PBS: Buffer de uso frecuente (receta para 500 ml).

PBS Buffer de fosfatos pH 7.4 (1%).

1). Agua ultra pura	400 ml
2). NaCl	4 g
3). KCl	0.1 g
4). Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.72 g
5). KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12 g
6). Aforar hasta	500 ml
7). Ajustar pH	7.4 con HCl
8). Conservar a 4 - 5 °C	

Es estable por 2 meses.

Desechar estas soluciones si aparecen cambios de coloración o precipitados.

**m-PBS – Medio de aspiración y lavado de ovocitos**

Para preparar 50 ml:

D-PBS (+) (Sol Stock)	48.50 ml
Penicilina	5.000 UI
Estreptomicina	5 mg
SFb (suero fetal bov) (3%)	1.5 ml

**Aclaración:**  
Dosificación del antibiótico: partiendo de una solución Penicilina-Estrepto de 10.000 UI/ml de Penicilina y 10 mg/ml de Estreptomicina, usar 500 µl

A 48.50 ml de la solución stock se le agregan los antibióticos y el suero.

Se filtra (0,22 µ).

Esta preparación debe utilizarse dentro de las 24 hs de preparado, lo que no se usa en este período se descarta. Se guarda en heladera sellado con parafilm hasta el momento de la obtención de los COCs, se pone en baño María antes del trabajo para templarlo.



**M-TCM-199 – Medio de maduración**

Para preparar 20 ml:

TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	17 ml
Penicilina	2.000 UI
Estreptomicina	2 mg
Suero fetal bovino (5%)	1 ml
Licor Folicular bovino (10%)	2 ml

**Aclaración:**

Dosificación del antibiótico: partiendo de una solución Penicilina-Estrepto de 10.000 UI/ml de Penicilina y 10 mg/ml de Estreptomicina, usar 200 µl

1º) Disolver 17 ml de solución TCM-199 con los antibióticos

3º) Agregar el SFb y el LFb

2º) Filtrar (0.22 µ)

4º) Colocar en estufa con tapa floja (38°C y 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad)

Antes de llevarlo a estufa se puede preparar las cajas de Petri con solución para lavado y las gotas para maduración cubiertas con aceite mineral y se colocan de inmediato en la estufa con atmósfera controlada.

**TCM-199 – Medio para desnudar los COC**

Para preparar 20 ml:

TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	17 ml
Penicilina	2.000 UI
Estreptomicina	2 mg
Suero fetal bovino (5%)	1 ml

**Aclaración:**

Dosificación del antibiótico: partiendo de una solución Penicilina-Estrepto de 10.000 UI/ml de Penicilina y 10 mg/ml de Estreptomicina, usar 200 µl

1º) Disolver 17 ml de solución TCM-199 con los antibióticos

3º) Agregar el SFb

2º) Filtrar (0.22 µ)

4º) Colocar en estufa con tapa floja (38°C y 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad)

Antes de llevarlo a estufa se puede preparar las cajas de Petri con solución para lavado y las gotas para maduración cubiertas con aceite mineral y se colocan de inmediato en la estufa con atmósfera controlada.

**Preparación del licor folicular:**

Se puncionan folículos preovulatorios de más de 8 mm de diámetro y se transfiere a tubos de centrífuga. Se centrifuga 2 veces a 500 G (2.500 rpm) durante 30 minutos. Se decanta. El líquido sobrenadante se inactiva en baño María a 56 °C durante 30 minutos; se fracciona en tubos pequeños o crioviales y se almacena congelado.



**Solución BO (Brackett and Oliphant) (Solución Stock) (Brackett and Oliphant, 1975)****Solución A (250 ml)**

Se disuelven en orden los siguientes componentes:

Agua ultra pura	200 ml aprox
NaCl	2,1546 g
KCl	0,0987 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,1085 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,0420 g
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0,03485 g
Rojo Fenol (solución 0,5%)	50 µl
Agua ultra pura	enrazar a 250 ml

Filtrar con filtro 0,22 µ

El líquido queda de color amarillo.

Se conserva refrigerado.

---

**Solución B (100 ml)**

Agua ultra pura	80 ml aprox
NaHCO <sub>3</sub>	1,2937 g
Rojo Fenol (solución 0,5 %)	20 µl
Agua ultra pura	enrazar a 100 ml

Filtrar con filtro 0,22 µ

Luego de componer la solución se burbujea con CO<sub>2</sub> hasta que adquiere un color salmón, se sella con parafilm y se guarda en heladera.

---

Las soluciones A y B, son soluciones stock, al igual que todas las soluciones almacenadas, se guardan selladas con parafilm y refrigeradas, se pueden conservar hasta 30 – 45 días en esas condiciones.

**Preparación de las Soluciones BO (Norio S, 1994).****Solución BO inicial (100 ml) (no stock):**

Solución A	76 ml
Piruvato de Sodio	0,01375 g
Penicilina	10.000 UI
Estreptomina	10 mg
Solución B	24 ml

Para la preparación se agrega a la solución A el piruvato de sodio y los antibióticos, luego se agrega la solución B y se homogeneiza.

Se filtra con filtros de 0,22 µ.

De esta solución se preparan los medios de lavado de semen, de lavado de ovocitos y de dilución de semen, como se explica a continuación:



**BO de lavado de semen (50 ml):**

Solución BO	50 ml
Caféina benzoato de Na	0,1942 g
Heparina (sol. de 1.000 UI/ml)	250 µl (o 250 UI)
Filtrar con filtros de 0,22 µ	

Para preparar una solución de Heparina, disolver 50 mg de Heparina en 2,5 ml de solución BO. Colocar en crioviales de 50 µl en el freezer. Cada criovial proporciona las 250 UI

**BO de lavado de ovocitos (25 ml):**

Solución BO	25 ml
Albúmina cristalizada de suero bovino	250 mg
Filtrar con filtros de 0,22 µ	

**BO de dilución de semen (25 ml):**

Solución BO	25 ml
Albúmina cristalizada de suero bovino	500 mg
Filtrar con filtros de 0,22 µ	

Las tres soluciones se almacenan en refrigerador hasta su uso (se pueden conservar hasta 24 hs)

Estos medios se colocan en la estufa con tapa floja para equilibrar con el CO<sub>2</sub> y la temperatura, por lo menos 60 minutos antes de la fertilización.

**D-TCM-199 – Medio de desarrollo**

En caso de utilizar este medio de cultivo, el desarrollo se debe realizar en cocultivo con células de la granulosa que cultivamos en la etapa de obtención de ovocitos como lo describimos anteriormente.

Preparar entre 3 y 12 horas antes.

Para preparar 20 ml de medio:

TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	15 ml
Penicilina	2.000 UI
Estreptomina	2 mg
Suero fetal bovino (5%)	1 ml
Licor Folicular (15%)	3 ml

**Aclaración:**  
Dosificación del antibiótico: partiendo de una solución Penicilina-Estrepto de 10.000 UI/ml de Penicilina y 10 mg/ml de Estreptomina, usar 200 µl

1º) Disolver 17 ml de solución TCM-199 con los antibióticos

2º) Filtrar (0.22 µ) (antes de agregar los sueros)

3º) Agregar el SFB y el LF

4º) Colocar en estufa con tapa floja (38°C y 5% de CO<sub>2</sub> y 90-100% de humedad)



**CR1aa (medio de desarrollo) (Solución Stock)****Solución A (385 ml)**

NaCl	3.3505 g
KCl	0.1155 g
Na Pyruvate	0.0220 g
NaHCO <sub>3</sub>	1.1005 g
Rojo Fenol (solución al 0,5%)	250 µl
Agua ultra pura	enrazar a 385 ml
Filtrar con filtro 0,22 µ	
Se conserva refrigerado.	

---

**Solución B (100 ml)**

Hemicalcium Lactate	0.2998 g
Agua ultra pura	enrazar a 100 ml
Esterilizar por filtración	

Las soluciones A y B pueden ser almacenadas por un mes en el refrigerador.

Las soluciones A y B, son soluciones stock, se guardan selladas con parafilm y refrigeradas, se pueden conservar hasta 30 – 45 días en esas condiciones.

**CR1aa – Medio de desarrollo**

Se prepara el medio CR1aa a partir de las soluciones stock (A y B).

Se adicionan y se mezclan uno por uno los siguientes componentes:

	<i>Para 50 ml:</i>	<i>Para 20 ml:</i>
Solución A	38.5 ml	15 ml
Solución B	10 ml	4 ml
BME aminoácidos esenciales	0.5 ml	0,2 ml
MEM aminoácidos no esenciales	0.5 ml	0,2 ml
Ácido L Glutámico (20 mg/ml)	0.5 ml	0,2 ml
Penicilina G	5.000 UI	2.000 UI
Estreptomocina Sulfato	5 mg	2 mg
Albúmina de suero bovino	150 mg	60 mg

Se filtra

Se puede almacenar en el refrigerador por 1 semana

Antes de su uso se adiciona con 5% de SFb y se forman las gotas de maduración previo remoción de los cúmulos.



**Referencias bibliográficas:**

- BALL G.D., COULAN C.B., FIELD C.S., HARMS R.W., THIE J.T., BYERS A.P. Effects of serum source on human fertilization and embryonic growth parameters In vitro. *Fertil Steril*, 44: 75-79. 1985.
- BARROS, C., VALDIVIA, M., YUNES, R., MELÉNDEZ, J. Acrosina en la penetración espermática en mamíferos. *Progresos en Biología Celular J Becerra M Pérez-Figares, P Fernández-Llevrez Eds Universidad de Málaga*. Pp 113-119. 1993.
- BENAOU, D.A., STOREY, B.T. Relationship between two types of mouse sperm surface sites that mediate binding of sperm to the zona pelucida. *Biol Reprod*; 39: 235-244. 1988.
- BIELANSKI, A., LOEWEN K., DEL CAMPO M.R., BETTERIDGE K., SIRARD M. AND S. WILLADSEN. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*; 40: 531-538. 1993.
- BRACKETT B.G. AND OLIPHANT. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*. 12: 260-274. 1975.
- BROGLIATTI, G.M., SWAN, C.D., ADAMS, G.P. Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves. *Theriogenology*; 43:177 abst. 1995.
- CABBIO. Manual para la producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos. Laboratorio Biotecnología de la Reproducción. INTA Balcarce. Junio 2006.
- CARNEY, E.W., BAVISTER, B.D. Increased atmospheric carbon dioxide stimulates hamster embryo development In vitro. *Biol Reprod*. 34, suppl. 1: 199. 1986.
- CRITSER, E.S., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., EYESTONE, W.H., NORTHEY, D.L., FIRST, N.L. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology*; 25: 150 abst. 1986.
- DEL CAMPO, M.R., DONOSO, M.X., PARRISH, J.J., GINTHER, O.J. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes. *Equine Vet Sci*;10: 18-22. 1990.
- DEL CAMPO, M.R., DEL CAMPO, C.H., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J. The application of new reproductive technologies to South American camelids. *Theriogenology*; 43: 13-20. 1995.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, OXON OX10 8 DE, UK. pp 102. 1994.
- HINRICHS, K. Embryo transfer in the mare: a status report. *Anim. Reprod. Sci*. 33: 227-240. 1993
- International Embryo Transfer Society (IETS), página web: <http://www.iets.org/manual.htm>
- IRITANI, A., NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil*; 50: 119-121. 1977.



- KRUIP, A.M., DIELEMAN, S.J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod Nutr Develop*; 22: 465-473. 1982.
- LAROCCA, C., CALVO, J., LAGO, I., ROSES, G Y VIQUEIRA, M. Diferentes fuentes de líquido folicular en el desarrollo in vitro de embriones bovinos. *Separata de Archivos de Zootecnia*. Vol 53, nº 203, pp: 329-332. 2004.
- LAROCCA C.S., KMAID AND CALVO. Effect of follicular fluid and oestrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocyte in vitro. *Theriogenology*, 39: 253. 1993
- LAROCCA C.S., KMAID, LAGO, I., ROSÉS, G., FILA, D., VIQUEIRA, M., AND BERGLAVAZ A. Influence of follicular fluid from different sources on in vitro development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 47: 292. 1997
- LEHNINGER, A.L. *Biochemistry*. Worth Publishers, New York. 1975.
- LIEBFRIED, L., FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*; 48: 76-86. 1979.
- MCKINNON, A.O., CARNEVALE, E.M., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L., SEIDEL, G.E. Heterogeneous and xenogenous fertilization of equine oocytes. *Proc 10th Equine Nutrition and Physiology Symposium*, San Antonio, TX, Society for Theriogenology, Hastings, NE; pp 197-201. 1992.
- NORIO S. *Manual of Embryo Transfer and in vitro fertilization in cattle*. Jica, Japan. 1994.
- PALASZ, A.T., TORNESI, M.B., ARCHER, J. AND MAPLETOFT, R.J. Media alternatives for the collection, culture AND freezing of Mouse AND cattle embryos. *Theriogenology* 44:705-714. 1995.
- PALASZ, A.T. AND DE LA FUENTE, J. Cultivo de embriones bovinos: Efecto de los medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos in vitro. Parte (II). <http://www.scribd.com/doc/6137003/9-Cultivo-de-Embriones-Bovinos>. 2008.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S., EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*; 25: 591-600. 1986.
- ROMERO, A. AND SEIDEL J.E. Jr. Effects of bovine follicular fluid on the maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 383-394. 1994.
- SATO, E., MATSUO, M., MIYAMOTO, H. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *J Anim Sci*; 68: 1182-1187. 1990.
- SIRARD, M.A., FLORMAN, H.M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., BARNES, F.L., SIMS, M.L., FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*; 40: 1257-1263. 1989.
- SIRARD M.A., ROY F., PATRICK B., MERIMILLOD P. AND GUILBAUT L.A. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology*, 44: 85-94. 1995.

