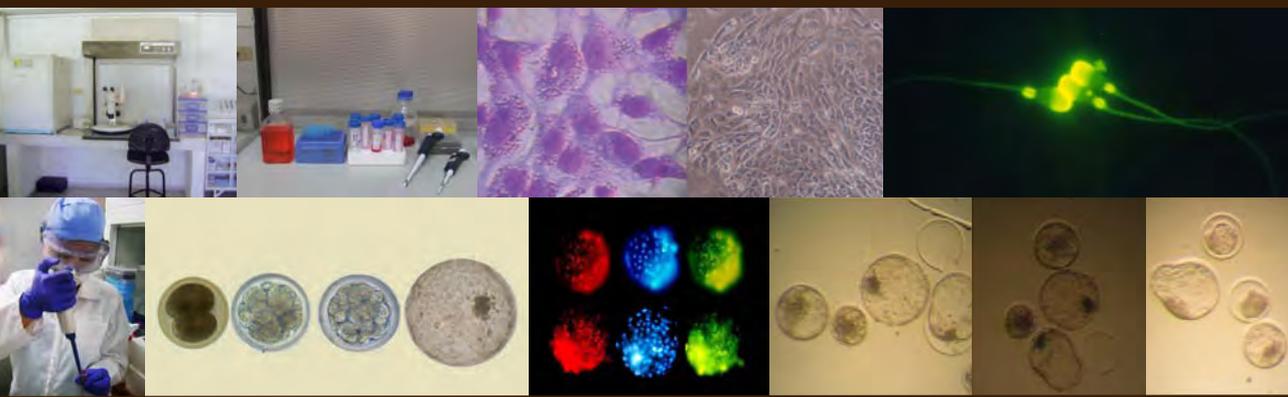


# Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos

—Libro de procedimientos—



Martha Olivera Angel  
Carlos Andrés Giraldo Echeverri  
—Editores académicos—



**Cultivo de tejidos reproductivos  
y producción y manipulación  
de embriones bovinos  
—Libro de procedimientos—**



# **Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos —Libro de procedimientos—**

## **Autores**

Ángela Patricia López Cardona  
Ariel Marcel Tarazona Morales  
Carlos Andrés Giraldo Echeverri  
Carolina Mesa Pineda  
David Andrey Cadavid Betancur  
Diana Maritza Echeverry Berrío  
Felipe Penagos Tabares  
Juan Camilo Álvarez Balvin  
Juliana Victoria Bedoya Jaramillo  
Luisa Fernanda Ortíz Román  
María Catalina Arias Londoño  
Martha Olivera Ángel  
Natalia Andrea Gómez Morales  
Yasser Yohan Lenis Sanín  
Zulma Tatiana Ruiz Cortés

## **Editores**

Martha Olivera Ángel  
Carlos Andrés Giraldo Echeverri

Agradecimientos a COLCIENCIAS  
Proyecto 1115-452-2153

Agradecimientos a la Universidad de Antioquia  
Estrategia Sostenibilidad 2013-2014  
Otorgada al Grupo de Investigación Biogénesis

Grupo de Investigación Biogénesis  
Universidad de Antioquia

2014

© Martha Olivera Ángel, Carlos Andrés Giraldo Echeverri  
© Ángela Patricia López Cardona, Ariel Marcel Tarazona Morales,  
Carlos Andrés Giraldo Echeverri, Carolina Mesa Pineda,  
David Andrey Cadavid Betancur, Diana Maritza Echeverry Berrío,  
Felipe Penagos Tabares, Juan Camilo Álvarez Balvin,  
Juliana Victoria Bedoya Jaramillo, Luisa Fernanda Ortíz Román,  
María Catalina Arias Londoño, Martha Olivera Ángel,  
Natalia Andrea Gómez Morales, Yasser Yohan Lenis Sanín,  
Zulma Tatiana Ruiz Cortés

ISBN: 978 958 8848 938  
Primera edición: mayo de 2014

Diseño de cubierta y diagramación  
Oficio Grafico. Sandra María Arango Mejía

Corrección de texto e indización  
Diego García Sierra

Todos los derechos reservados. Esta publicación puede  
ser reproducida en todo o en parte y por cualquier medio,  
citando la fuente.

Esta publicación tuvo el apoyo de:  
Colciencias, Proyecto 1115-452-2153  
Universidad de Antioquia, estrategia Sostenibilidad 2013-2014



© Fondo Editorial Biogénesis  
Universidad de Antioquia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Ciudadela de Robledo, Carrera 75 N° 65 - 87  
Teléfonos: (574) 219 91 49 - 219 91 00 - 219 91 19  
Medellín, Colombia

## Autores

Ángela Patricia López Cardona  
Zootecnista, Máster en Investigación en Ciencias  
Veterinarias, estudiante de doctorado  
en Investigación en Ciencias Veterinarias

Ariel Marcel Tarazona Morales  
Zootecnista, Máster en Ciencias Básicas  
Biomédicas, Doctor en Ciencias Animales.  
Docente del Departamento de Producción Animal,  
Universidad Nacional de Colombia

Carlos Andrés Giraldo Echeverri  
Médico Veterinario, Máster en Ciencias Básicas  
Biomédicas. Docente de fisiología animal en la  
Universidad de Antioquia

Carolina Mesa Pineda  
Zootecnista

David Andrey Cadavid Betancur  
Médico Veterinario, estudiante de Maestría  
en Epidemiología

Diana Maritza Echeverry Berrío  
Médica Veterinaria, estudiante de Maestría en  
Ciencias Animales

Felipe Penagos Tabares  
Estudiante de Medicina Veterinaria

Juan Camilo Álvarez Balvin  
Ingeniero Agropecuario, Magíster en Ciencias  
Biotecnología. Docente Investigador Politécnico  
Colombiano Jaime Isaza Cadavid

Juliana Victoria Bedoya Jaramillo  
Estudiante de Medicina Veterinaria

Luisa Fernanda Ortiz Román  
Microbióloga y Bioanalista, Máster en Ciencias  
con mención en Microbiología.

María Catalina Arias Londoño  
Zootecnista

Martha Olivera Ángel  
Médica Veterinaria, Doctora en Ciencias Agrarias

Natalia Andrea Gómez Morales  
Ingeniera Biológica, estudiante de Maestría  
en Ciencias Animales

Yasser Yohan Lenis Sanín  
Médico Veterinario. Zootecnista, Máster  
en Ciencias Animales. Docente Universidad  
de Antioquia y Corporación Universitaria  
Remington.

Zulma Tatiana Ruiz Cortés  
Médica veterinaria, Doctora en Ciencias  
Veterinarias

Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos: Libro de procedimientos.  
Ángela Patricia López Cardona, Ariel Marcel Tarazona Morales, Carlos Andrés Giraldo Echeverri, Carolina Mesa Pineda, David Andrey Cadavid Betancur, Diana Maritza Echeverry Berrio, Felipe Penagos Tabares, Juan Camilo Álvarez Balvín, Juliana Victoria Bedoya Jaramillo, Luisa Fernanda Ortíz Román, María Catalina Arias Londoño, Martha Olivera Angel, Natalia Andrea Gómez Morales, Yasser Yohan Lenis Sanín, Zulma Tatiana Ruiz Cortés. Medellín: Universidad de Antioquia.

Fondo Editorial Biogénesis, 2014

175 p.

ISBN: 978 958 8848 938

1. Cultivo celular. 2. Semen. 3. Sexaje. 4. Fertilización in vitro. 5. Endometrio

# Contenido

Introducción.....	13
Capítulo 1 El laboratorio.....	15
Pautas básicas de bioseguridad y asepsia.....	16
Manejo adecuado de elementos potencialmente peligrosos.....	16
Manejo adecuado de los equipos.....	16
Técnica aséptica.....	16
Control microbiológico.....	19
Manejo adecuado de residuos en el laboratorio.....	20
Equipos básicos para el cultivo celular y de embriones.....	22
Cámara de bioseguridad (cabina de flujo laminar).....	22
Incubadora de CO <sub>2</sub> .....	24
Estereoscopio.....	25
Microscopio invertido de contraste de fases.....	26
Centrífuga.....	27
Refrigeradores y congeladores.....	27
Equipos utilizados en la preparación de medios.....	28
Equipos para lavado y esterilización de material.....	30
Equipos auxiliares.....	31
Equipos usados en biología molecular.....	34
Materiales.....	35
Preparación de filtros autoclavables.....	35
Anexo 1. Manipulación segura de reactivos.....	36
Anexo 2 Técnica de higiene de las manos.....	38
Anexo 3 Indumentaria.....	39
Bibliografía recomendada.....	41
Capítulo 2. Medios y reactivos para cultivo y evaluación celular de tejidos reproductivos y embriones in vitro.....	43
Recomendaciones generales para la preparación de medios.....	44
Preparación de los diferentes medios y reactivos.....	44
Solución salina fisiológica.....	44
Solución salina yodada.....	45

Solución buferada fosfatada PBS 10X (Stock).....	45
Solución salina buferada fosfatada PBS 1X:.....	46
Medio HEPES TL Stock: medio para lavado y selección de Complejos Cúmulo-Oocitos (CCOs).....	46
Medio HEPES de trabajo.....	47
Medio para cultivo de células de la granulosa y oviductales in vitro.....	48
Medio para cultivo de células oviductales in vitro.....	49
Medio para cultivo de endometrio.....	49
Preparación de Hank's Balanced Salt Solution.....	50
Solución hiposmótica para test de Host.....	51
Solución de inducción de reacción acrosomal (MI).....	51
Solución Talp Sperm Modificado (10x) para preparación de Percoll 90%.....	52
Percoll al 90% y 45%.....	52
Medio de maduración in vitro.....	54
Medio de fertilización TL modificado stock.....	55
Medio de fertilización de trabajo (Fert).....	56
Medio Talp Sperm Stock.....	57
Medio Talp Sperm de trabajo.....	58
Medio de desarrollo CR1-AA Stock.....	58
Medio de desarrollo CR1-AA de trabajo.....	59
Preparación de colorantes utilizados en la evaluación de embriones y semen.....	60
Solución Giemsa.....	60
Solución eosina nigrosina.....	61
Solución de tinción PISUM - FITC.....	61
Solución Hoechst 33342 (10 µg/ml) para tinción de oocitos y embriones (SIGMA B2261).....	62
Ioduro de propidio.....	62
Solución naranja de acridina para celularidad.....	62
Solución de tinción JC-1.....	63
Solución Z-VAC-FMK.....	63
Solución Acridine Orange (AO) – Ethidium Bromide (EB) (AO/EB).....	63
Solución fosfato salina suplementada con polivinil pirrolidona (PBS + PVP 0,025%).....	64
Solución de paraformaldehído al 4% (%m/v).....	64
Solución de tritón X-100 al 0,5% (V/V) y citrato de sodio al 0,1% (W/v).....	65
Buffer de equilibrio (stock del kit de 9,6 ml).....	65
Enzima rTDT –Deoxinucleotidil terminal transferasa recombinante– (stock inicial de 20 µl).....	65
Nucleótidos dUTPs (stock del kit de 50 µL).....	66
Preparación del mix de reacción.....	66
SSC 2X (preparar un stock de trabajo de 10 ml).....	66

Preparación de reactivos utilizados en la técnica para sexaje de embriones .....	67
Solución pronasa 0,5%.....	67
Activación de buffer de lisis RTL plus .....	67
Medio PBS con polivinil pirrolidona (PVP) al 0,3% para sexaje de embriones.....	67
Solución EDTA.....	67
Solución de buffer TAE para la electroforesis en gel de agarosa.....	67
Preparación de medios utilizados en la criopreservación de células reproductivas y embriones bovinos.....	68
Medios para vitrificación de embriones bovinos .....	68
Solución de vitrificación 1 (SV1) de embriones bovinos.....	68
Solución de vitrificación 2 (SV2) de embriones bovinos.....	69
Solución de sucrosa (MS).....	69
Soluciones de calentamiento M1, M2 y M3.....	70

## Capítulo 3 Cultivo de células del tracto reproductivo de la hembra bovina.....

71

Procedimientos para el cultivo de células de granulosa bovina .....	72
Toma de muestras: recolección de ovarios.....	72
Obtención de células de la granulosa bovina.....	74
Cultivo de células de la granulosa bovina.....	74
Características del cultivo de células de granulosa bovinas .....	76
Procedimientos para el cultivo de células de oviducto bovinas .....	77
Toma de muestras: recolección de oviductos .....	77
Recuperación de fluido oviductal .....	78
Siembra de células oviductales .....	80
Evaluación morfológica de cultivo de células oviductales.....	82
Indicaciones para cocultivo de embriones .....	84
Procedimientos para aislamiento y cultivo primario de células endometriales epiteliales bovinas (CEEP).....	84
Toma de muestras: recolección de úteros .....	84
Preparación de úteros para aislamiento de CEEP.....	86
Aislamiento mecánico de CEEP .....	88
Cultivo de CEEP.....	90
Características de las CEEP a los dos, cuatro y seis días de cultivo.....	91
Características de las CEEP a los ocho, doce y catorce días de cultivo.....	91
Bibliografía recomendada.....	93

Capítulo 4. Procedimientos para la evaluación de semen utilizado en la producción de embriones bovinos .....	95
Evaluación macroscópica de semen fresco.....	96
Cuadro espermático estándar.....	97
Test hiposmótico (HOST).....	100
Prueba de reacción acrosomal .....	103
Bibliografía recomendada .....	107

Capítulo 5. Procedimientos para producción de embriones bovinos in vitro .....	109
Toma de muestras: recolección de ovarios.....	110
Aspiración folicular.....	111
Selección de Complejos Cúmulo-Oocito (CCO) para maduración .....	114
Maduración in vitro, MIV.....	116
Fertilización in vitro, FIV .....	118
Interacción de los gametos.....	120
Cultivo in vitro, CIV.....	124
Inseminación in vitro.....	124
Evaluación de clivaje y alimentación de embriones bovinos in vitro.....	125
Evaluación de la producción de embriones .....	127
Anormalidades durante el cultivo de embriones.....	130
Empaque y transporte para transferencia de embriones (TE).....	131
Anexo 4. Formatos de producción de embriones in vitro.....	134
Bibliografía recomendada .....	137

Capítulo 6. Procedimientos para el sexaje de embriones bovinos por PCR.....	139
Remoción de zona pelúcida de embriones bovinos .....	140
Purificación de ADN total a partir de células.....	140
Amplificación de DNA total para sexaje de embriones.....	143
Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% .....	146
Bibliografía recomendada .....	149

Capítulo 7. Tinciones utilizadas en oocitos y embriones bovinos.....	151
Montaje de embriones para tinciones fluorescentes.....	151
Tinción de Hoechst para evaluación nuclear.....	153
Tinción con JC-1 potencial mitocondrial transmembranal.....	154
Tinción con dihidro-rodamina (DHR) para evaluación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	155
Tinción con AO/EB para evaluación de apoptosis.....	156
Evaluación de caspasas activas, tinción con Z-VAC-FMK.....	157
Tinción con naranja de acridina para celularidad.....	158
Técnica de túnel para la detección de apoptosis en embriones bovinos.....	159
Doble tinción con Hoechst/Ioduro de Propidio para evaluación de la viabilidad embrionaria.....	161
Bibliografía recomendada.....	163

Capítulo 8. Procedimientos para la criopreservación de células reproductivas y embriones bovinos.....	165
Vitrificación de embriones bovinos.....	166
Devitrificación de embriones bovinos.....	167
Congelación de embriones bovinos.....	169
Descongelación de embriones bovinos.....	170
Lavado de CEEP precongelamiento.....	171
Congelación de CEEP.....	172
Descongelación y cultivo de CEEP.....	173
Bibliografía recomendada.....	175



# Introducción

El Grupo de Investigación Biogénesis se fundó en 1995 en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. Inicialmente desarrolló la línea de investigación en producción de embriones bovinos *in vitro*, la cual ha sido la principal fuente de formación científica para muchos profesionales y estudiantes del sector, además de generar conocimiento científico a nivel regional e internacional. Posteriormente se desarrollaron las líneas de cultivos celulares, en la medida en que las preguntas de investigación se fueron ampliando, así como las necesidades del sector productivo pecuario.

Con este libro de procedimientos queremos compilar los protocolos de trabajo en diferentes líneas de cultivo celular, los cuales hemos venido probando y ajustando en nuestras investigaciones, con el fin de ponerlos a disposición de la comunidad académica y científica y poder así compartir experiencias. Además, presentamos algunos capítulos introductorios acerca del comportamiento dentro del laboratorio, el manejo de equipos y normas básicas de bioseguridad.

Esperamos que esta publicación sea del agrado de los lectores.





# Capítulo 1

## El laboratorio

**Autores:** María Catalina Arias Londoño,  
Carolina Mesa Pineda y Diana Maritza Echeverry Berrío.

En un laboratorio, para fines de cultivo de células reproductivas y de producción de embriones, es indispensable realizar una evaluación inicial de los posibles riesgos (tanto para los cultivos como para los operarios) que pueden presentarse durante la ejecución de los procedimientos.

Es importante resaltar que cada laboratorio es diferente, y por tanto los sistemas de bioseguridad y asepsia deben estar diseñados de acuerdo a las especificaciones de cada uno y de los procesos que se lleve a cabo. Sin embargo, se pueden seguir algunas pautas generales, que buscan disminuir los riesgos y optimizar los procesos, y que pueden ser aplicadas en cualquier laboratorio, así como el manejo de equipos y materiales necesarios en cada una de las actividades.

## Pautas básicas de bioseguridad y asepsia

### Manejo adecuado de elementos potencialmente peligrosos

Todo el personal que manipule reactivos y agentes químicos peligrosos, o que de alguna forma tenga acceso a ellos, debe estar plenamente informado de la manera correcta de manipular y almacenar estos agentes (ver Anexo 1).

### Manejo adecuado de los equipos

Para el manejo de los equipos de laboratorio se deben seguir estrictamente las recomendaciones del fabricante. Más adelante en este capítulo se encuentra una sección donde se describe el manejo adecuado de los equipos más utilizados en el cultivo de células reproductivas y en la producción de embriones bovinos *in vitro*.

### Técnica aséptica

La técnica aséptica es la principal medida preventiva para disminuir riesgos de contaminación. En este sentido, es importante tener en cuenta los siguientes aspectos:

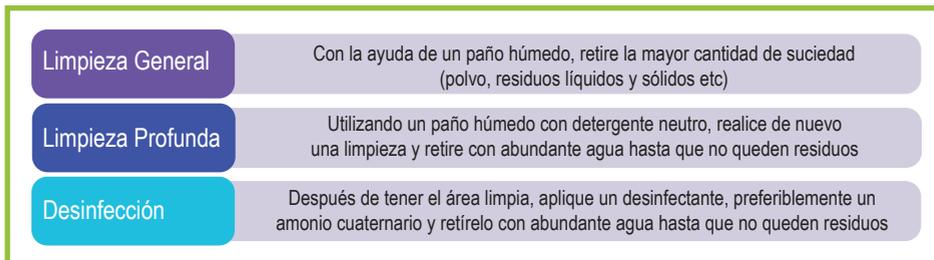
- a) *Flujo de personal*: Debe ser restringido y claramente señalizado (ver figura 1.1). Usualmente las áreas de acceso común están a la entrada, y el nivel de restricción se incrementa mientras más interno sea el lugar en el laboratorio. Los cuartos de cultivo deben ubicarse en la zona de mayor restricción, la cual corresponde a la de menor flujo de personal.



Figura 1.1. Señalización para informar acerca del flujo de personal.



- b) *Programa de limpieza, aseo y desinfección (LAD)*: El laboratorio debe contar con un programa LAD, el cual permite reducir la carga microbiológica ambiental y mantenerla en niveles mínimos para reducir el riesgo de contaminación en los procesos realizados. El programa LAD es aplicable tanto a superficies como a equipos, y se debe realizar teniendo en cuenta las fases descritas en la figura 1.2. Se recomienda la aplicación del LAD al menos una vez al mes, pero es de aclarar que esto depende de los procesos y flujo de trabajo en cada laboratorio en particular.



**Figura 1.2.** Fases para el programa de limpieza, aseo y desinfección (LAD).

*Nota:* Seguir estrictamente las indicaciones sugeridas por los fabricantes de los productos que se vayan a utilizar.

- c) *Aseo personal*: Todo el personal debe estar aseado, con el cabello recogido, no debe utilizar accesorios (aretes, anillos, cadenas), esmaltes ni perfumes. Una de las mayores fuentes de contaminación para los cultivos celulares son las manos de los operarios, por lo tanto es indispensable una adecuada limpieza para la aplicación de una buena técnica aséptica. Para realizar el lavado de manos, se debe utilizar un jabón antiséptico de uso externo no perfumado y seguir unos pasos sencillos que garantizan una adecuada técnica aséptica (ver Anexo 2).
- d) *Delimitación y manejo del área de trabajo*: Con el fin de optimizar la realización de los procesos y evitar la contaminación cruzada, es necesario delimitar áreas de trabajo. Debe existir un *área sucia*, destinada para el descarte y lavado de material contaminado y de material biológico, antes de su ingreso al *área limpia*, donde permanecen los implementos estériles y equipos en condiciones asépticas, y donde se realiza la manipulación de tejidos biológicos y demás procesos que no requieren un alto grado de esterilidad. Finalmente, es importante establecer un *área de cultivo*, donde se realizan todos los procesos que implican manipulación directa de las células y embriones.
- e) *Mantenimiento de la esterilidad de implementos y medios para cultivo celular*: Es necesario asegurarse de la esterilidad del material del laboratorio (cajas, puntas, filtros, etc.) y de los medios de cultivo que tendrán contacto directo con las células. Para esto, existen

diferentes métodos de esterilización, tanto físicos como químicos, sin embargo los más utilizados en laboratorios de embriones y cultivo celular por su relativa baja toxicidad son los que se describen en las tablas 1.1 y 1.2. Además, en cada protocolo para la preparación de los medios de cultivo celular y producción de embriones se debe contemplar la inclusión de productos antibióticos, que permitan disminuir el riesgo de contaminación. Por otro lado, se debe tener especial cuidado con el uso de agentes químicos, pues existen productos como el hipoclorito que pueden causar deterioro progresivo de los equipos.

**Tabla 1.1.** Aplicación de agentes físicos para el control de microorganismos

Método	Usos recomendados	Limitaciones
Calor húmedo con autoclave	Esterilización de instrumentos, ropa blanca, utensilios, medios y otros líquidos.	Ineficaz contra microorganismos que estén en materiales impermeables al vapor, y no puede usarse para materiales sensibles al calor.
Calor seco con horno de aire caliente	Esterilización de materiales impermeables (como el vidrio) o que se dañen con la humedad (como los instrumentos cortantes y los metales).	Es destructivo de los materiales que no puedan resistir altas temperaturas durante largos periodos de tiempo.
Radiación con luz ultravioleta	Desinfección de superficies y materiales sensibles al calor (por ejemplo, materiales plásticos).	Para ser eficaz, la luz debe ser absorbida. No pasa a través de vidrio transparente u objetos opacos. Irrita los ojos y la piel, y tiene poco poder de penetración.
Filtración (la forma de uso se amplía más adelante)	Esterilización de fluidos biológicos sensibles al calor (por ejemplo, suero, enzimas, algunas vitaminas, hormonas y antibióticos, entre otros termolábiles). Los filtros son elementos cuyo principio de acción se basa en una membrana que tiene un diámetro de poro de 0,2 $\mu\text{m}$ , que retiene bacterias y hongos de tamaños mayores, pero no virus. Debido a que la contaminación con virus es relativamente inusual, el sistema de filtración es suficiente para asegurar la esterilidad de medios líquidos.	El fluido debe estar relativamente libre de material particulado.

*Fuente:* Adaptada de Montoya H., 2000.



**Tabla 1.2** Aplicación de agentes químicos para el control de microorganismos

Grupo principal	Características adicionales	Modo de acción	Compuestos específicos	Uso recomendado	Limitaciones
Alcoholes	Desnaturalizan las proteínas. Son agentes deshidratantes con acción detergente.	Cuanto más carbonos tiene el alcohol, más germicida es.	El alcohol metílico es menos bactericida y más tóxico; el alcohol etílico, usado a concentraciones de 70%, es el menos tóxico. Otros alcoholes, como el propílico, el butírico y el amílico, son de uso menos frecuente.	Antisepsia para la piel. A una concentración del 60% matan los virus si no hay materia orgánica extraña.	Antiséptico
Compuestos de amonio cuaternario	Desnaturalizan las proteínas y dañan la membrana celular.	Actúan contra bacterias gram positivas y son fungicidas.	Cloruro de benzalconio, Cloruro de benzetonio y Cloruro de cetilpiridinio.	Son agentes higienizantes.	No son esporicidas.

*Fuente:* Adaptada de Montoya H., 2000.

## Control microbiológico

El control microbiológico es fundamental para el éxito de un cultivo celular, ya que las contaminaciones constituyen el principal factor de pérdida de muestras y cultivos. La prevención es la mejor manera de control, y se puede lograr de tres formas:

- **Prevención de la contaminación:** Evitando que los microorganismos lleguen a los medios de cultivo, los equipos y los materiales.
- **Prevención de la transmisión:** Impidiendo el traspaso de infecciones entre equipos y medios, o de cultivos contaminados a aquellos que no tienen contaminación.
- **Prevención del deterioro:** El deterioro de materiales y equipos, como oxidaciones, humedades u otros daños, puede ser fuente de microorganismos que pueden contaminar los procedimientos que se realizan.

Es de vital importancia seguir estrictamente los pasos mencionados en la figura 1.2 ya que cualquier material orgánico que se encuentre en las superficies, equipos o materiales puede inactivar los agentes químicos para el control de microorganismos, reduciendo su efectividad.

Cuando se presentan contaminaciones en los procesos de cultivo celular o de embriones es recomendable realizar cultivos microbiológicos para la detección del agente causal y de esa manera poder elegir el método o producto adecuado para el tratamiento del problema.

La figura 1.3 muestra los principales riesgos para los cultivos celulares.

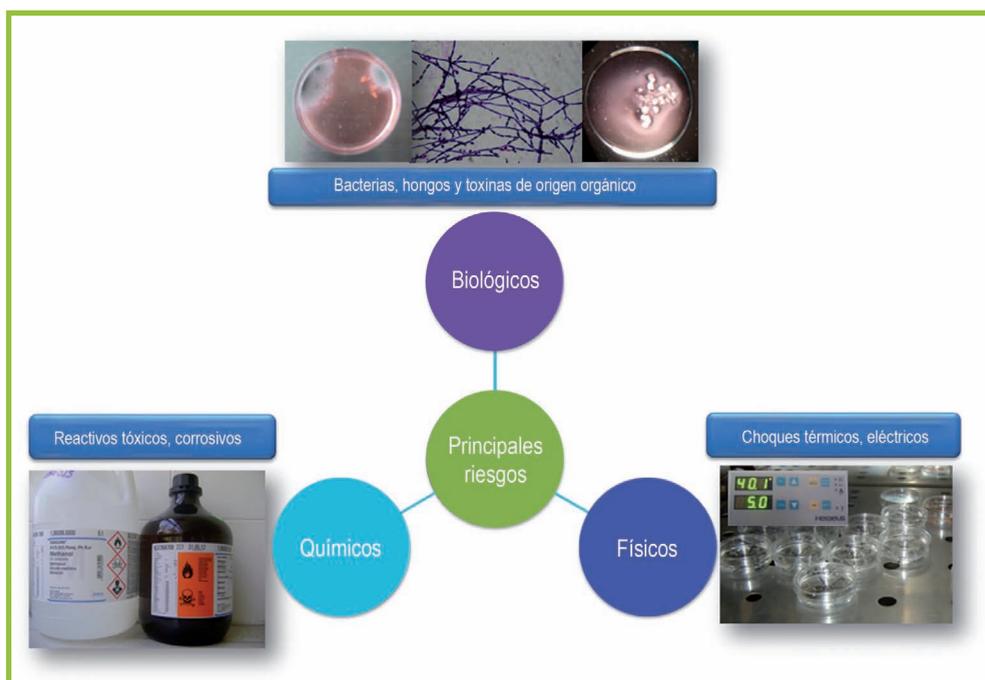


Figura 1.3. Principales riesgos para los cultivos celulares.

## Manejo adecuado de residuos en el laboratorio

- a) *Disposición de residuos sólidos:* Los residuos sólidos, como vidrio, plástico o papel, que no presenten ningún tipo de riesgo biológico, químico o físico, deben ser separados de la siguiente manera: en bolsa gris, aquellos que sean reciclables, y en bolsa verde, aquellos que no sean reciclables. Ambos, a su vez, deben ser separados en recipientes de plástico rotulado para este tipo de desechos.

Los residuos sólidos contaminados con residuos biológicos, como muestras de sangre, tejidos, etc., deben ser descartados en bolsas rojas. Los recipientes para la



disposición de estos desechos deben tener el rótulo de “riesgo biológico” o “residuos peligrosos”, deben ser de plástico resistente, de color rojo y tener tapa de seguridad, siempre deben ser manipulados con guantes. Los residuos sólidos como agujas, vidrios, cuchillas y demás objetos cortopunzantes contaminados o no, deben ser descartados en un recipiente conocido como “guardián” (más pequeños, con tapa de seguridad y dispositivos para el descarte de agujas y cuchillas), debidamente rotulado como “riesgo físico y biológico” (ver figura 1.4).



**Figura 1.4.** Bolsas y recipientes para residuos sólidos en el laboratorio.

- b) *Disposición de residuos líquidos:* Los residuos líquidos hidrosolubles que no presenten ningún tipo de riesgo (como PBS, solución salina, algunos medios de cultivo o alcohol antiséptico) pueden inactivarse por esterilización por calor y descartarse directamente en los sifones del área sucia o de lavado.

Los residuos líquidos liposolubles, como grasas y aceites, deben disponerse en recipientes destinados para tal fin; en caso de presentar algún tipo de riesgo, deben inactivarse esterilizándose por calor.

Los residuos líquidos que sean corrosivos, que contengan metales o cianuro, o que puedan generar sólidos precipitables, no se pueden descartar por el sistema de alcantarillado. De acuerdo al tipo de residuo que se descarte, se deposita en un recipiente específico y descartarlo a través de la recolección de residuos peligrosos (radiactivos, corrosivos, volátiles, etc.)

La disposición final de todos los residuos del laboratorio debe realizarla una entidad especializada en el manejo de residuos de laboratorio; todas las bolsas, guardianes y recipientes de disposición deben estar debidamente rotulados para facilitar su labor.

## Equipos básicos para el cultivo celular y de embriones

Los equipos deben usarse tal y como viene indicado en los manuales de los fabricantes. El mantenimiento se debe realizar de manera periódica, preferiblemente de carácter preventivo, con el fin de asegurar un buen funcionamiento de los equipos en todo momento y para cada equipo se debe tener un registro escrito, cerca al equipo, con la fecha y el responsable de uso.

### Cámara de bioseguridad (cabina de flujo laminar)

La cámara de bioseguridad actúa como barrera primaria para evitar el riesgo de infecciones transmitidas por agentes que se encuentran en el aire, impidiendo la salida de estos a la atmósfera y, por consiguiente, su inhalación por el personal.

Estas cabinas poseen filtros de alta eficiencia de partículas de aire (High-Efficiency Particulate Air, HEPA), los cuales atrapan el 99,97% de las partículas de 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro y el 99,99% de las partículas de mayor tamaño. La filtración de aire en estas cabinas en el área de trabajo proporciona protección del material, lo cual evita su contaminación; su eficacia depende de aspectos como el sistema de ventilación, la ubicación con relación a las corrientes y al movimiento del aire y la integridad de los filtros HEPA. Es importante hacer mantenimiento de estos equipos por lo menos una vez año.

### Tipos de cámaras de bioseguridad utilizadas en el cultivo de células reproductivas y en la producción de embriones

- **Clase I:** Es una cámara de manipulación abierta, ventilada y provista de un sistema de protección para el material. El aire fluye desde la parte frontal sobre el material. Esta cámara posee un sistema de *flujo horizontal*, que protege toda la zona de manipulación. Una cabina de flujo horizontal proporciona adecuada protección estéril para los cultivos, siendo muy conveniente para preparar medios y otros reactivos (ver figura 1.5).

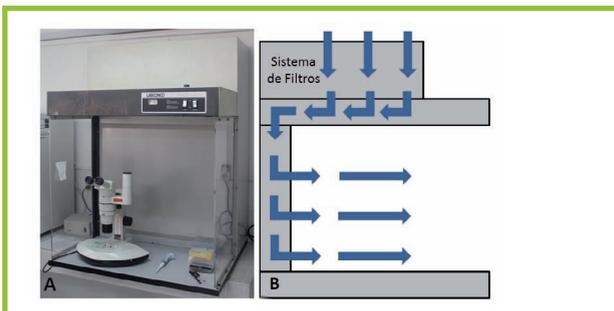
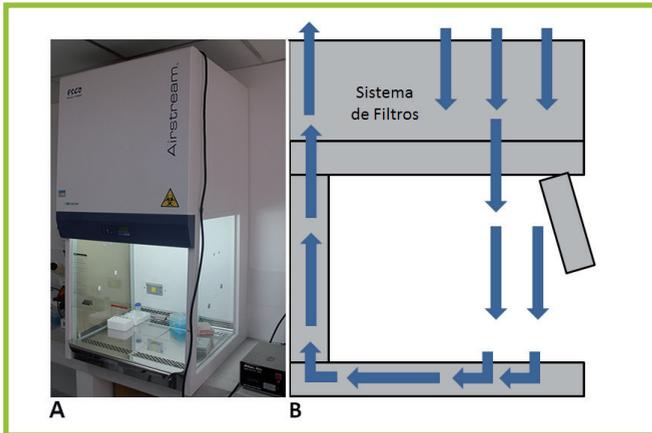


Figura 1.5. Cabina de flujo laminar horizontal. A. Vista frontal, B. Vista lateral.



- Clase II:** Esta cámara presenta un sistema de *flujo vertical*: el aire entra atravesando el techo de la cabina, desciende sobre el material y recorre la zona inferior del área de trabajo (ver figura 1.6). Protege así al manipulador, el material y el medio ambiente. Está dotada de un sistema de flujo vertical que previene la posible exposición a los aerosoles y las salpicaduras, las cuales pueden ser generadas cuando se realizan los procesos. (Freshney, 2005).



**Figura 1.6.** Cabina de flujo laminar vertical. A. Vista frontal; B. Diagrama con vista lateral.

### Recomendaciones de uso:

- Limpiar y desinfectar con alcohol las superficies de la cabina, y encender el flujo de aire por lo menos 15 minutos antes de comenzar el trabajo.
- Ubicar los materiales necesarios de la mitad hacia el fondo de la cámara, cuidando que los elementos grandes no les tapen el flujo de aire a los elementos más pequeños.
- El panel de vidrio para visualización dentro de la cámara no debe ser abierto mientras esta esté en funcionamiento.
- No se deben usar mecheros ni vórtex dentro de la cabina. El calor y la vibración pueden producir disturbios en el flujo de aire, y en general en el funcionamiento de la cámara.
- Se debe minimizar al máximo la circulación de personas detrás del operador.
- La rejilla por donde circula el aire no debe ser bloqueada, ya que puede ocasionar contaminación del material.
- El trabajo en la cabina debe realizarse con movimientos cuidadosos y pausados y desde la mitad hacia el fondo de la superficie de trabajo.

- Al finalizar el trabajo, retirar todos los materiales de la cámara y limpiarla con alcohol al 70%.
- Encender la lámpara de luz UV por lo menos 12 horas una vez a la semana o a criterio profesional de acuerdo al volumen de trabajo.

## Incubadora de CO<sub>2</sub>

La incubadora de CO<sub>2</sub> es un equipo que permite mantener condiciones de temperatura y humedad, así como porcentajes de gases apropiados y constantes para el crecimiento celular.

En una incubadora de células, la constancia de la temperatura (invariabilidad durante prolongados periodos de tiempo, con oscilaciones inferiores a 0,5°C) es más importante que su precisión, pues una temperatura constante mantiene las células en condiciones en las que las tasas de crecimiento son homogéneas. Los valores de temperatura dependerán de la especie, y siempre se debe tratar de mantener la temperatura normal corporal del animal. Dado que el CO<sub>2</sub> afecta el pH de los medios, esto se debe tener en cuenta según el tipo de cultivo celular que se vaya a desarrollar. El balance de gases dependerá del órgano del cual proviene el tejido de cultivo. Finalmente, es necesario tener en cuenta que la humedad para todos los cultivos de células de vertebrados debe ser máxima.

Las incubadoras de CO<sub>2</sub> cuentan con un sistema de circulación de aire y un termostato seguro que reduce un posible sobrecalentamiento y fallas generales en el control de la temperatura. También es importante que esté elaborada en materiales resistentes a la corrosión y que sus piezas sean fácil y completamente desmontables para permitir las labores de limpieza y desinfección (Freshney, 2005).

### Recomendaciones de uso:

- Graduar la temperatura y el porcentaje de CO<sub>2</sub> requerido de acuerdo a las necesidades del cultivo (ver figura 1.7).
- Dejar que la incubadora se estabilice, hay algunas que cuentan con ciclos de esterilización y las temperaturas a las cuales se deben mantener en cada ciclo están especificadas en los manuales de los fabricantes).
- Medir el CO<sub>2</sub> con un equipo especializado (indicador de CO<sub>2</sub>) y ajustarla al valor real, para asegurar que la cantidad de CO<sub>2</sub> establecido en el visualizador de la incubadora es realmente la que se encuentra en el interior (ver figura 1.8).
- Llenar los reservorios de agua siempre con agua destilada estéril.
- Abrir la incubadora con poca frecuencia y en tiempos breves, para evitar el desbalance de gases.



- Llevar registro diario de los valores de temperatura y  $\text{CO}_2$  para garantizar que permanezcan constantes.



Figura 1.7. Funciones básicas para la graduación de la incubadora de  $\text{CO}_2$ .

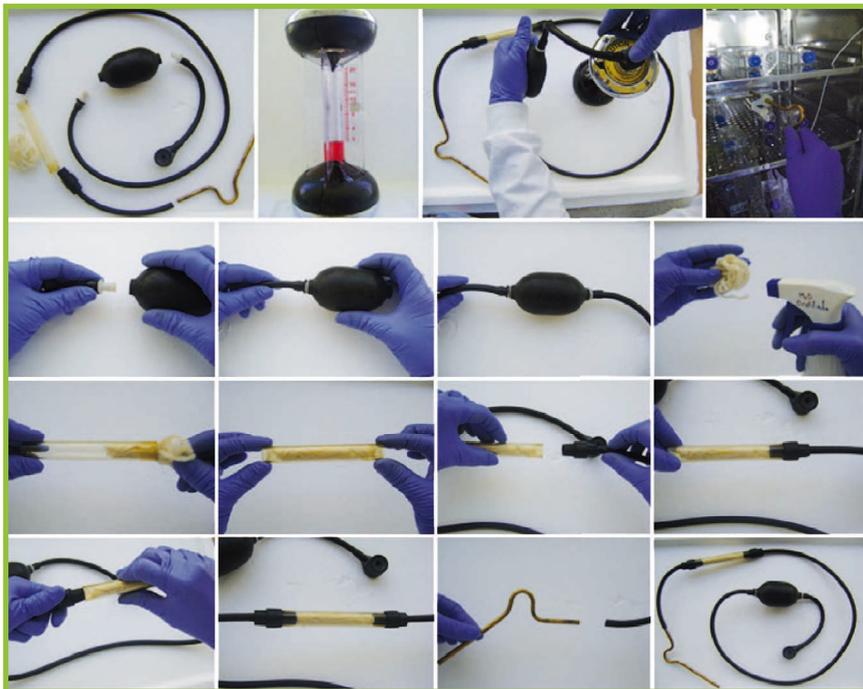


Figura 1.8. Medición del  $\text{CO}_2$  de la incubadora, con el indicador de  $\text{CO}_2$ .

## Estereoscopio

Es un instrumento óptico que permite la observación y manipulación de una muestra que es demasiado pequeña para ser estudiada a simple vista, pero demasiado grande para ser estudiada bajo el microscopio compuesto (ver figura 1.9). Su magnificación va desde cerca de 5X hasta más de 60X. Es un equipo indispensable para los procesos de producción de embriones *in vitro*.



Figura 1.9. Estereoscopio



Figura 1.10. Microscopio invertido de contraste de fases.

### Recomendaciones de uso:

- Antes de conectarlo, se debe verificar que el interruptor esté apagado, de lo contrario, la lámpara se podría fundir.
- Mantenerlo siempre limpio y desinfectarlo periódicamente para evitar el crecimiento de hongos en los lentes.
- Evaluar los cultivos en campo oscuro y campo brillante, pues de esta manera se pueden hacer evidentes algunas contaminaciones que no son visibles en luz blanca.
- Al terminar la observación, es importante bajar completamente la intensidad lumínica, apagar, desconectar y cubrir el equipo (Freshney, 2005).

### Microscopio invertido de contraste de fases

Este equipo permite observar los cultivos celulares directamente en las cajas de Petri o botellas de cultivo, lo que facilita enormemente la evaluación de la morfología celular y la detección temprana de contaminaciones; además, en este equipo se realizan las diferentes evaluaciones espermáticas. (Ver figura 1.10)

### Recomendaciones de uso:

- La muestra debe enfocarse con el menor aumento y luego aumentarlo moviendo los objetivos del revólver.
- Estandarizar el sistema de iluminación que se adapte mejor a las células y métodos de cultivo que se empleen.
- (Ver recomendaciones para el estereoscopio).



Figura 1.11. Centrifuga

## Centrífuga

En este equipo se pone en rotación una muestra, para separar, por fuerza centrífuga, sus componentes o fases, en función de su densidad (ver figura 1.11). Básicamente, las centrifugas se utilizan para concentrar o lavar células, las cuales pueden sedimentarse satisfactoriamente entre 80 y 100 gravedades, ya que altas gravedades pueden causar daño celular y promover la aglutinación en el pellet (Freshney, 2005). Además se requieren para realizar el gradiente de Percoll.

Existen muchos tipos de centrifugas, y por tanto se debe escoger la que más se ajuste a las necesidades del laboratorio.

### Recomendaciones de uso:

- Calibrar siempre el peso de las muestras, de tal manera que la centrifuga quede balanceada en todos sus extremos.
- Asegurarse de cerrar perfectamente los tubos que contienen las muestras y la tapa de la centrifuga.
- Si se utilizan temperaturas de centrifugación bajas, asegurarse de secar bien la centrifuga o dejarla abierta después del proceso para evitar su deterioro por humedad y posible crecimiento de hongos.

- Esperar siempre que la centrifuga se detenga por completo antes de sacar las muestras.
- No detener nunca la centrifugación por la fuerza, pues se puede dañar el equipo.

## Refrigeradores y congeladores

Los reactivos y medios de cultivo poseen diferentes temperaturas de almacenamiento (la información correspondiente está disponible en los insertos técnicos y en las etiquetas del producto). Aunque muchos de ellos pueden permanecer a temperatura ambiente, algunos requieren temperaturas de refrigeración (2-4°C) o de congelación (-20°C); para temperaturas menores se requiere de congeladores especializados de hasta -70°C o termos de nitrógeno de -196°C.

### **Recomendaciones de uso:**

- Disponer los reactivos y medios de tal manera que el frío circule libremente entre ellos y que sean fáciles de tomar cuando se necesiten.
- Mantener en la puerta de la nevera el inventario de reactivos y medios que contiene, y su ubicación.
- No permitir el crecimiento de escarcha sobre los frascos almacenados.
- Abrir la nevera solamente cuando sea necesario y por periodos de tiempo breves, para evitar los cambios drásticos de temperatura interna, que pueden alterar los reactivos y medios almacenados.
- Realizar control de temperatura y llevar registro sobre ella.

## **Equipos utilizados en la preparación de medios**

### **Purificador de agua**

El agua purificada se emplea para protocolos de lavado de material y para preparación de medios. El primer propósito puede cumplirse con agua simplemente destilada o desionizada, mientras que el segundo requiere agua ultrapura de grado reactivo.

### **Recomendaciones de uso:**

- El equipo de purificación debe escogerse de acuerdo a la calidad del agua con la cual se cuenta en el laboratorio.
- El agua ultrapura debe utilizarse inmediatamente y nunca debe ser almacenada.
- Los equipos de purificación deben mantenerse perfectamente limpios y de manera periódica se debe realizar desinfección de aquellas partes que se pueda (para ello, ver los manuales de los equipos).
- Se deben realizar análisis microbiológicos periódicamente para garantizar la calidad del agua.

### **Balanza analítica**

La balanza analítica es útil para pesar cantidades pequeñas de reactivos necesarios para la preparación de medios o suplementos para cultivo.

### **Recomendaciones de uso:**

- Seleccionar un lugar para mantener la balanza; debe ser un mesón firme, lejos de vibraciones (de la centrífuga o el vórtex), corrientes de aire y flujo de personas.



- La balanza debe estar perfectamente equilibrada (usualmente tiene una burbuja de nivelación en un costado).
- Utilizar recipientes especiales para pesar reactivos. Se puede utilizar papel pergamino o de aluminio.



Figura 1.12. Agitador magnético

### Agitador magnético

Los agitadores magnéticos son útiles para disolver medios en polvo u homogenizar ciertas sustancias. En algunos casos pueden utilizarse para realizar disgregación o resuspensión de células, en este caso debe utilizarse un agitador que sea capaz de mantener una temperatura de entre 37 y 39°C (ver figura 1.12).

#### Recomendaciones de uso:

- Mantener magnetos estériles de varios tamaños.
- Chequear la temperatura y la velocidad antes de poner el medio o las células sobre la plancha caliente.

### Potenciómetro

Este equipo se utiliza para medir el potencial de hidrógeno, o pH, de una sustancia (ver figura 1.13), y la escala de medición va desde 0 a 14. Para la mayoría de las células, el pH óptimo está entre 6,6 y 7,4; en el caso de los embriones y las células de la granulosa, el pH debe estar entre 7,3 y 7,4.



Figura 1.13. Potenciómetro.

### Recomendaciones de uso:

- Estandarizar la curva de pH diariamente, utilizando por lo menos dos referentes comerciales (usualmente se utilizan pH 4, pH 7 y pH 10).
- Lavar con abundante agua destilada la parte inferior del electrodo de pH, antes y después de introducirlo en una muestra. Los electrodos nunca se deben limpiar con toallas ni otros objetos, ni se debe tocar su punta.
- El electrodo siempre debe conservarse inmerso en una solución de KCl 3M.

## Equipos para lavado y esterilización de material

### Autoclave



La autoclave es un instrumento que permite la esterilización por calor húmedo (ver figura 1.14). Usualmente se utiliza para esterilizar objetos de vidrio, metal y plástico (puntas, filtros y otros no sensibles a esta temperatura). La esterilización se realiza habitualmente a 121°C, a 1 atmósfera de sobrepresión, durante un tiempo de entre 20 a 30 minutos.

Figura 1.14. Autoclave

### Recomendaciones de uso:

Colocar cinta sensible a la presión, pues esta ayuda a identificar el material ya esterilizado.

- El material al interior de la autoclave debe quedar con espacios para permitir el flujo de vapor caliente.
- La válvula se debe mantener abierta por lo menos diez minutos después de encendida la autoclave, para permitir que el vapor frío no cree presión interna. Posteriormente, la válvula se pone en posición horizontal.
- Mantener en observación periódicamente, mientras el equipo está encendido, hasta que la aguja del manómetro indique la presión de esterilización.
- Nunca abrir la autoclave a la fuerza; se debe esperar a que el equipo disminuya su temperatura después de la esterilización, para evitar quemaduras del operario.
- Secar el equipo y dejar la autoclave destapado para permitir evitar su deterioro.



Figura 1.15. Horno convencional

## Horno

El horno es un equipo con circulación de aire caliente que permite secar rápidamente el material esterilizado. Se puede utilizar un horno convencional (ver figura 1.15), o bien un horno microondas.

### Recomendaciones de uso del horno convencional:

- Determinar adecuadamente la temperatura de secado, generalmente no debe ser superior a 90°C.
- Los materiales deben disponerse en el interior del horno dejando espacio, de tal manera que se permita el flujo de aire entre ellos.
- Recomendaciones de uso del horno microondas:  
Tener presente que en este horno no se pueden introducir objetos metálicos.

Realizar diez ciclos de 30 segundos cada uno, con intervalos de diez minutos entre ciclo y ciclo para evitar que se quemé el material.

Durante el periodo de esterilización no se debe abrir la puerta del microondas para evitar contaminación.



Figura 1.16. Termo de nitrógeno líquido.

## Equipos auxiliares

### Termo de nitrógeno

El termo de nitrógeno es un recipiente que consta de un tanque externo metálico que sirve de protector, en cuyo interior se encuentra otro tanque, que contiene el nitrógeno líquido a -196°C. Entre el tanque interno y el externo existe un espacio sin aire que contiene un material aislante. El cuello del tanque se tapa sin hermetismo para permitir la salida de los vapores de nitrógeno (Trujillo y Henao, 2000) (ver figura 1.16).

El nitrógeno es un gas incoloro, inodoro e insípido. Es apenas soluble en agua. En el termo de nitrógeno se almacena el semen para la fertilización *in vitro*, así como embriones y células congeladas para cultivos celulares y cocultivo de embriones.

### Recomendaciones de uso:

- Guardar y usar el nitrógeno líquido únicamente en lugares frescos y ventilados, ya que si se evapora suficiente gas del líquido en un ambiente cerrado, el porcentaje de oxígeno puede llegar a ser tóxico.
- Evitar todo contacto con la piel. Como medida de precaución, se deben emplear guantes y, en lo posible, máscaras de protección facial, ya que la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) puede ocasionar quemaduras en la piel.
- Si por algún motivo no se localiza la muestra requerida o no se puede extraer, se debe bajar la canastilla que hay en el interior del termo y esperar 15 segundos para que esta se enfríe nuevamente y se pueda repetir la operación.
- Las pajillas y los crioviales que no van a ser utilizados no se deben exponer a cambios continuos de temperatura, ya que esto reduce la viabilidad de las células.
- Elaborar un registro semanal del nivel de nitrógeno en el termo. Nunca se debe permitir que el nitrógeno descienda por debajo de su nivel mínimo ya que la conservación de la viabilidad de las células en el termo depende de la constancia de la temperatura de almacenamiento.
- Marcar correctamente las canastillas y escalerillas para facilitar la búsqueda de las muestras; es importante llevar un inventario y no cambiar las canastillas de su sitio o traspasarlas a otro termo.



Figura 1.17. Baño serológico

### Baños serológicos y otros dispositivos de calefacción

Son dispositivos que permiten calentar las muestras de forma indirecta, mediante su suspensión en agua atemperada. La temperatura del agua se controla mediante un sensor y un programador (ver figura 1.17)

Los principales riesgos que pueden presentarse al usar este tipo de equipos son: quemaduras, rotura de recipientes de vidrio, derrames, generación de calor y humedad ambiental y contacto eléctrico indirecto por envejecimiento del material.

### Medidas preventivas:

- Asegurar el equipo con ayuda de soportes.
- Disponer de un termostato de seguridad para limitar la temperatura.
- No llenar completamente el equipo con agua.



- No introducir recipientes de vidrio ordinario, pues este no soporta la temperatura o puede presentar filtraciones.



**Figura 1.18.** Micropipetas de diferentes volúmenes.

## Micropipetas

Una micropipeta permite tomar con exactitud volúmenes pequeños de sustancias líquidas. Posee puntas específicas para cada volumen, las cuales son descartables entre cada medición (ver figura 1.18). La micropipeta ideal es la que más se acerca al volumen que se necesita (es decir, si requiere un volumen de 40  $\mu\text{l}$  es preferible pipetear con la micropipeta de 5-50  $\mu\text{l}$  que con una de 10-100 $\mu\text{l}$ ).

### Recomendaciones de uso:

- No exceder nunca la capacidad de volumen de la micropipeta.
- No sacar nunca la micropipeta antes de subir todo el émbolo, y asegurarse de que en la punta no se formen burbujas, de lo contrario, se deberá pipetear nuevamente.
- Guardar la micropipeta en el volumen máximo de su rango, para evitar que se descalibre.
- Limpiarla con cuidado, tratar de no golpearla y ubicarla en el soporte de la manera indicada.
- Evitar que el líquido entre en contacto con la micropipeta.
- Realizar mantenimiento de las pipetas al menos cada 6 meses.

## Vórtex

Los vórtex son instrumentos que permiten mezclar soluciones mediante un dispositivo que gira en un solo punto, a determinadas revoluciones por minuto. Para su uso se debe tener en cuenta no apoyar en exceso el tubo o elemento que está agitando, pues esto, sumado al movimiento normal del equipo, genera un desgaste rápido de la parte mecánica del equipo. Además, aunque el equipo esté en velocidad cero, es recomendable dejarlo apagado, ya que aun así consume energía (ver figura 1.19).



**Figura 1.19.** Vórtex.

## Equipos usados en biología molecular



Figura 1.20. Termociclador.

### Termociclador PTC 200

Es un equipo que permite realizar los ciclos de temperatura necesarios para amplificar el ADN (ver figura 1.20). Este dispositivo viene equipado con bloques, en los cuales se ubican los tubos de PCR; cada uno de ellos consta de espacio para 96 tubos aproximadamente y una tapa con rueda para asegurarlos.

Panel de control: Se encuentra en la parte frontal del termociclador. Este panel contiene los controles necesarios para programar los ciclos para la amplificación.

### Recomendaciones de uso:

- Antes de utilizar el termociclador, asegurarse de que el bloque no esté en uso.
- Usar el termociclador con la tapa caliente para evitar la condensación en la parte superior del tubo que contiene la muestra.
- Al introducir los tubos en el termociclador, hacerlo con guantes para evitar contaminaciones.



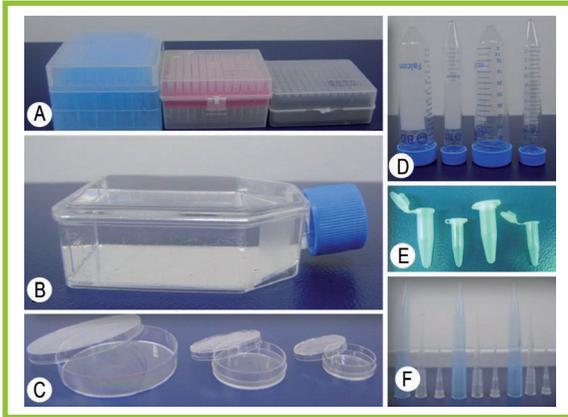
Figura 1.21. Cámara de electroforesis

### Cámara de electroforesis

Equipo que permite determinar el peso molecular de productos de PCR o moléculas grandes de DNA (ver figura 1.21).

### Recomendaciones de uso:

- Al conectar los electrodos, conectar negro con negro y rojo con rojo.
- Observar si al conectar los electrodos hay presencia de burbujas; estas indican que la cámara quedó correctamente conectada.
- Terminado el corrido, vaciar el buffer de corrido y guardarlo para una próxima electroforesis.
- Verificar que el voltaje de trabajo del equipo sea el indicado de acuerdo al protocolo de proceso que se esté realizando.



**Figura 1.22.** Materiales de uso frecuente en un laboratorio de cultivo de células y embriones. A: gradilla de micropuntas, B: botellas de cultivo, C: cajas de Petri, D: tubos cónicos, E: microtubos cónicos, F: micropuntas (tips).

## Materiales

Los materiales más comúnmente utilizados en un laboratorio de cultivo de células son de plástico, preferiblemente de poliestireno. En la mayoría de los casos, dichos materiales se utilizan una sola vez. En caso de poderse reutilizar, se deben lavar con un protocolo que garantice que después de completarlo el material quede totalmente limpio y libre de agentes biológicos o químicos que puedan afectar los cultivos (ver figura 1.22).

## Preparación de filtros autoclavables

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para preparar filtros utilizados como método de esterilización de medios de cultivo para células y embriones *in vitro*.
- **Materiales:** Filtros autoclavables, membranas de  $0,2 \mu\text{m}$ , caja de Petri de 60 mm.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, pinzas estériles.
- **Medios:** Agua destilada desionizada estéril.



**Figura 1.23** Partes de un filtro autoclavable. 1) Cuerpo, 2) tapa de cierre, 3) empaque, 4) soporte de la membrana, 5) tapa de la membrana.

### Procedimiento:

Una vez los filtros hayan sido sometidos al proceso de lavado, desinfección y secado, se debe realizar el siguiente procedimiento en la cabina de flujo laminar, utilizando guantes:

- Distribuir las partes del filtro en la cabina (ver figura 1.23).
- Verter 6 ml de agua destilada desionizada estéril en una caja de Petri de 60 mm y colocar allí la membrana de  $0,2 \mu\text{m}$  para que se hidrate.
- Colocar el empaque en la ranura de la tapa para la membrana, ejerciendo presión (ver figura 1.24 – recuadro 1).

- d) El soporte para la membrana presenta dos lados: identificar la rejilla y colocarla sobre el cuerpo del filtro hacia arriba (ver figuras 1.24 – recuadros 2 y 3).
- e) Con las pinzas, colocar la membrana hidratada sobre el soporte y ubicarla en el centro, teniendo cuidado para no romperla (ver figuras 1.24 – recuadros 4 y 5).
- f) Colocar la tapa de la membrana previamente ensamblada con el empaque sobre la membrana, ejerciendo presión suave y asegurándose de que las guías se ubiquen en las ranuras del cuerpo (ver figuras 1.24 – recuadros 6 y 7).
- g) Colocar la tapa de cierre sobre el cuerpo y ajustar bien (ver figuras 1.24 – recuadros 8 y 9).
- h) Empacar los filtros en papel craft y llevarlos a ciclo de esterilización en autoclave (ver figura 1.24 – recuadro 10).

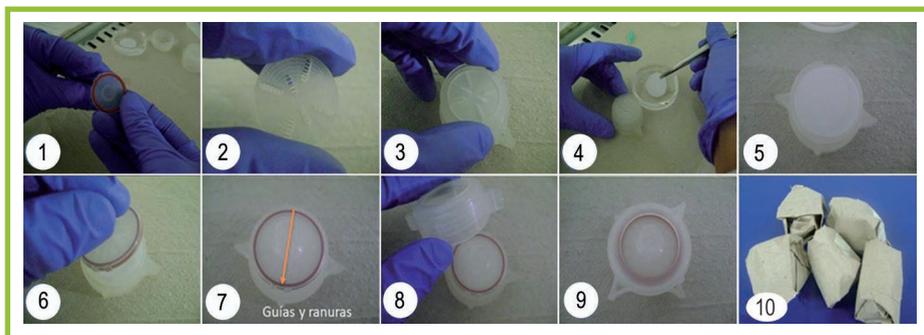
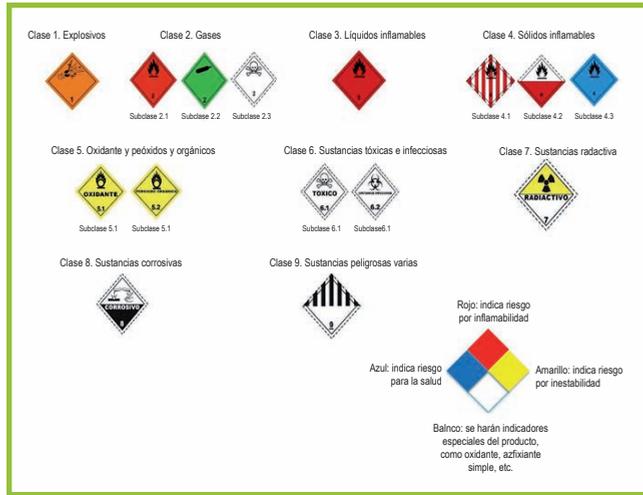


Figura 1.24. Preparación de filtros autoclavables.

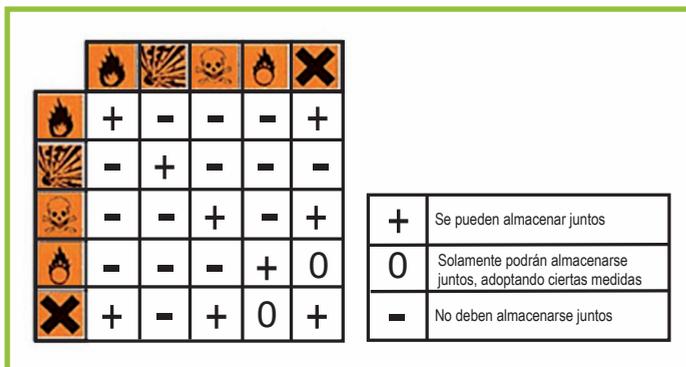
## Anexo 1. Manipulación segura de reactivos

La adecuada manipulación de los reactivos y su correcto almacenamiento disminuyen las posibilidades de accidentes comunes en un laboratorio, como derrame de líquidos, rompimiento de envases, entre otros. Es importante siempre revisar la etiqueta del producto para identificar el riesgo que puede generar a la salud, su reactividad con otras sustancias, la forma adecuada de almacenarse y la manera de proceder ante un incidente inesperado con determinado químico o reactivo. Existen dos sistemas de clasificación importantes, que se pueden implementar adecuadamente en la mayoría de los laboratorios de investigación. El primer sistema de clasificación es el de las Naciones Unidas (UN), conocido como el *Libro Naranja*, en el cual las sustancias químicas están clasificadas en nueve categorías, que a su vez se pueden dividir en subcategorías o subclases (ver figura 1.25). El segundo sistema de clasificación es el de la NFPA (National Fire Protection Association), conocido comúnmente como Norma NFPA 704, y que se representa por un diamante de fuego (ver figura 1.25).



**Figura 1.25.** Sistemas de clasificación de las Naciones Unidas y la Asociación Nacional para la Prevención del Fuego (NFPA).

En el sistema de clasificación de la NFPA (Norma NFPA 704), cada color tiene un significado especial dentro del rombo. Adicionalmente, los primeros tres colores: azul, rojo y amarillo cuentan con una escala numérica entre 0 y 4, indicando el grado de peligrosidad de la sustancia química, siendo 0 el de menor riesgo y 4 el de mayor riesgo. El color blanco es un espacio para consideraciones especiales del reactivo, por ejemplo, si reacciona al contacto con el agua o con el aire.



**Figura 1.26.** Pictograma Merck

Con estos sistemas de clasificación de sustancias químicas se elaboran tablas que permiten determinar cómo almacenar correctamente los reactivos. La tabla o guía de mayor uso es la de los pictogramas de Merck (ver figura 1.26), que indica de forma gráfica y sencilla cuáles reactivos pueden o no almacenarse

juntos. Por ejemplo, los inflamables pueden ser almacenados en el mismo estante, pero no deben guardarse junto a los explosivos, comburentes o peligrosos.

*Nota:* Se aconseja almacenar las sustancias inflamables en la parte inferior de los estantes, en lugares frescos, en envases color ámbar y alejados del calor y del sol. Las sales deben ser almacenadas en lugares frescos y libres de humedad. El estante de los reactivos debe ubicarse en un lugar lejos de equipos que generen vibración, calor o que puedan afectar la calidad de los reactivos, o viceversa.

## Anexo 2

### Técnica de higiene de las manos

Para laboratorio de cultivos celulares y embriones  
Grupo de investigación Biogénesis



Tiempo estimado de 40" a 60"



1  
Humedezca las manos con agua



2  
Aplique suficiente jabón para cubrir toda la superficie



3  
Frótese sus manos palma contra palma



4  
Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda y viceversa.



5  
Frótese las palmas de las manos entre sí con los dedos entrelazados



6  
Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta



7  
Frótese con movimiento de rotación ambos pulgares



8  
Frótese la punta de los dedos en forma circular contra la palma de la otra mano y viceversa



9  
Frótese cada muñeca con la mano opuesta



10  
Enjuague con abundante agua



11  
Séquelas con una toalla de un solo uso



12  
20" a 30" de secado y sus manos son seguras



Realizado según directrices de la Organización Mundial de la Salud



## Anexo 3. Indumentaria

### Para trabajo en el laboratorio

En todos los procedimientos en un laboratorio de producción de embriones *in vitro* y cultivo de tejidos reproductivos es necesario utilizar una bata blanca de manga larga, polainas o zapatos especiales para laboratorio, gorro y tapabocas. Todas estas medidas son necesarias para evitar contaminaciones en los cultivos.

Cuando se va a llevar a cabo la preparación de fluorocromos o se va a trabajar con estos, es necesario usar guantes y tapabocas en todo momento, ya que todos son potencialmente carcinogénicos. Además, se deben manipular sin exponerlos a la luz directa porque son altamente sensibles a esta. Los fluorocromos se almacenan en alícuotas y se envuelven en papel aluminio para evitar la exposición a la luz.

### Para colección de muestras en la planta de beneficio

Para recolectar material biológico en la planta de beneficio se deben utilizar los siguientes elementos:

- Overol de manga larga blanco
- Gorro
- Casco blanco
- Botas de caña alta blancas
- Guantes de nitrilo

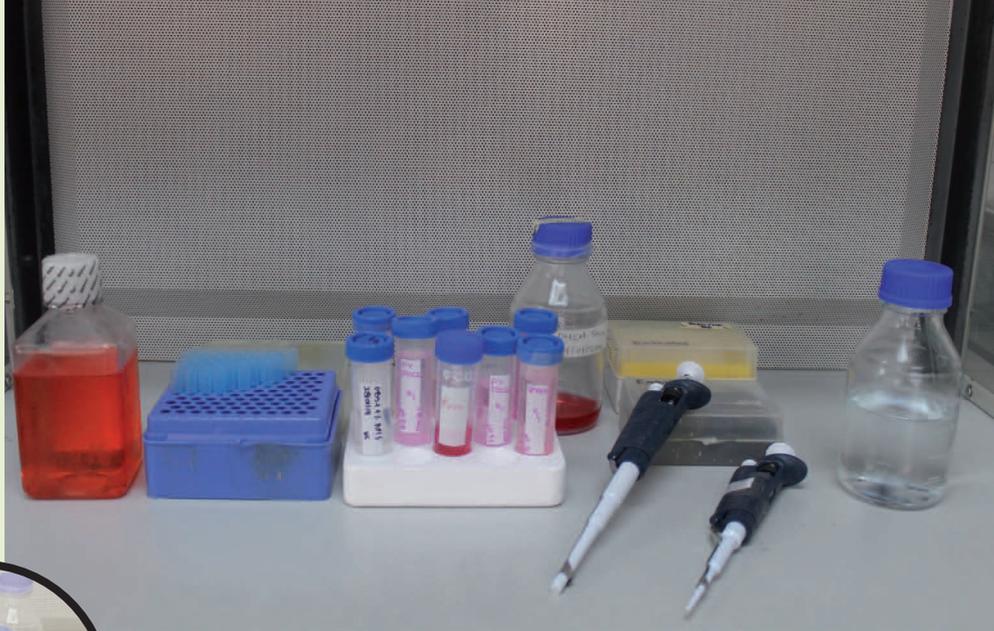




## Bibliografía recomendada

- Freshney, R.I. (2005), *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5ª ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Montoya, H. (2000), *Microbiología básica para el área de la salud y afines*, Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
- NFPA (2002), *National Fire Codes, NFPA 704*, Edición electrónica.
- Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA (2010). Manipulación segura de sustancias químicas. Documento de estudio para curso virtual.
- Trujillo, L.E y Henao, G. (1987), Normas para el manejo de termos de almacenamiento de semen. *Despertar Lechero*. Colanta. Vol. 2, pp. 64-72.





## Capítulo 2

### **Medios y reactivos para cultivo y evaluación celular de tejidos reproductivos y embriones *in vitro***

**Autores:** Natalia Andrea Gómez Morales,  
Ángela Patricia López Cardona, Luisa Fernanda Ortiz Román,  
Juliana Victoria Bedoya Jaramillo y Felipe Penagos Tabares

En un laboratorio de cultivo de células y de producción de embriones, uno de los procedimientos más críticos es la preparación de los diferentes medios requeridos para cada actividad. El estricto seguimiento de los protocolos de preparación, la rigurosidad con las normas de bioseguridad y la asepsia en cuanto al manejo de los equipos y reactivos garantizan en parte el éxito de los demás procedimientos a realizar. Cualquier pequeño descuido puede ser la causa de la ausencia de resultados favorables. A continuación se describen los protocolos y algunas recomendaciones generales para tal fin.

## Recomendaciones generales para la preparación de medios

- Todos los materiales de trabajo que no sean de vidrio deben ser preferiblemente nuevos y estériles.
- Es importante que todos los equipos a utilizar estén en condiciones adecuadas para su uso.
- Al realizar la homogenización de los medios, hacerlo de manera suave y constante, especialmente si contienen BSA y SFB, para evitar la formación de espuma, lo cual impide la incorporación total del componente al medio.
- Exceptuando el pesaje de los reactivos y la mezcla en el vórtex, todos los procedimientos deben realizarse en cabina de flujo laminar.
- Todos los reactivos pueden pesarse usando papel de celulosa bond blanco, papel pergamino de bajo calibre o papel aluminio, excepto el cloruro de calcio y el cloruro de magnesio, que solo deben pesarse en papel aluminio (son altamente higroscópicos).
- Utilizar siempre guantes de nitrilo en todos los procesos.
- Cuando se preparen colorantes fluorescentes, utilizar bata, guantes y mascarilla para disminuir el riesgo de trastornos posteriores debido a sus cualidades mutagénicas y carcinogénicas.

La figura 2.1, describe un esquema general de los pasos para la preparación de medios.



Figura 2.1. Esquema general para la preparación de un medio para cultivo celular o producción de embriones.

## Preparación de los diferentes medios y reactivos

### Solución salina fisiológica

Para preparar 1 litro de solución:

Medio para transporte de ovarios, oviductos o úteros de planta de beneficio.



1. Pesar 9 g de NaCl y colocarlos en una probeta graduada de 1000 ml.
2. Llenar hasta el nivel de 1000 ml usando agua destilada.
3. Disolver completamente utilizando agitador magnético.
4. Verter la solución en botellas de vidrio previamente lavadas.
5. Marcar con cinta de autoclave, incluyendo la fecha y el nombre del producto.
6. Esterilizar la solución por autoclave, dejando la tapa un poco abierta para evitar que la botella explote.
7. Cerrar muy bien las botellas y almacenarlas a temperatura ambiente hasta su uso.

## Solución salina yodada

Para preparar 1 litro de solución:

1. Tomar 20 ml de yodo y ponerlo en 980 ml de solución salina fisiológica.
2. Mezclar en el agitador magnético por 10 minutos
3. Hacer alícuotas en tubos de 50 ml previamente marcados con la fecha (dd/mm/aa) y el nombre del producto y del responsable.

## Solución buferada fosfatada PBS 10X (Stock).

Para preparar 1 litro de solución:

1. Pesar los siguientes reactivos y colocarlos en una probeta de 1000 ml:

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de sodio	NaCl	80 g	Temperatura ambiente	Sigma S-5886
Cloruro de potasio	KCl	2 g	Temperatura ambiente	Sigma P-5405
Fosfato de sodio	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	14,4 g	Temperatura ambiente	Sigma S-9638
Fosfato de potásio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,4 g	Temperatura ambiente	Sigma P-5655

2. Llenar hasta el nivel de 1000 ml usando agua destilada.
3. Disolver completamente utilizando agitador magnético.
4. Corregir el pH a 7,4.
5. Verter la solución en botellas de vidrio previamente lavadas.
6. Marcar con cinta de autoclave, incluyendo la fecha y el nombre del producto.

7. Esterilizar la solución por autoclave, dejando la tapa de la botella un poco abierta para evitar que explote.
8. Cerrar muy bien las botellas y almacenarlas a temperatura ambiente hasta su uso.

## Solución salina buferada fosfatada PBS 1X

Para preparar 1 litro de solución:

1. Pesar los siguientes reactivos y colocarlos en una probeta de 1000 ml

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Fosfato de sodio	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,44 g	Temperatura ambiente	Sigma S-9638
Fosfato de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,24 g	Temperatura ambiente	Sigma P-5655
Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	8 g	Temperatura ambiente	Sigma S-5886
Cloruro de potasio	$\text{KCl}$	0,2 g		Sigma P-5405

2. Llenar hasta el nivel de 1000 ml usando agua destilada.
3. Disolver completamente utilizando agitador magnético.
4. Corregir el pH a 7,3.
5. Verter la solución en botellas de vidrio previamente lavadas.
6. Marcar con cinta de autoclave, incluyendo la fecha y el nombre del producto.
7. Esterilizar la solución por autoclave, dejando la tapa un poco abierta para evitar que la botella explote.
8. Cerrar muy bien las botellas y almacenarlas a temperatura ambiente hasta su uso.

Nota: También se pueden tomar 100 ml de PBS 10X (stock) y diluirlos en 900 ml de agua destilada.

## Medio HEPES TL Stock: medio para lavado y selección de Complejos Cúmulo-Oocitos (CCOs).

Para preparar 50 ml de medio:

1. Marcar un tubo cónico de 50 ml en la tapa y el costado así: HEPES Stock (HS), fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Pesar y adicionar al tubo cónico los siguientes reactivos:



Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de sodio	NaCl	0,335 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-5886
Cloruro de potasio	KCl	0,01175 gr	Temperatura ambiente	Sigma P-5405
Bicarbonato de sodio	NaHCO <sub>3</sub>	0,0084 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-6014
Fosfato de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0,0023 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-9638
HEPES		0,120 gr	Temperatura ambiente	Sigma H-9136

- Llevar exactamente a 50 ml de agua destilada desionizada estéril o agua grado inyectable. Agitar utilizando vórtex.
- Adicionar los siguientes compuestos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
DL Lactic Acid (60% Syrup)	93 µl	Nevera a 4°C	Sigma L-7900
Rojo fenol	50 µl	Temperatura ambiente	Sigma P-0290

- Disolver por completo por agitación manual suave o vórtex y adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0,015 gr	Temperatura ambiente	Sigma C-7902
Cloruro de magnesio	MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	0,005 gr	Temperatura ambiente	Sigma M-2393

- Disolver por completo por agitación manual suave.
- Ajustar el pH a 7,4 con 300 µl (aprox.) de NaOH 1M.
- Chequear la osmolaridad (debe estar en el rango de 280-300 mOsm).
- Almacenar en nevera a 4°C, máximo por una semana.

## Medio HEPES de trabajo

Medio para búsqueda y selección de Complejos Cúmulo-Oocito (CCOs). Este medio regula el pH con la concentración de CO<sub>2</sub> ambiental, por tanto no debe abrirse en incubadora y se puede trabajar largos periodos de tiempo en cabina.

### Para preparar 50 ml de medio:

- Homogenizar un tubo cónico de 50 ml HS (HEPES TL Stock) con vórtex.
- Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Albúmina de Suero Bovino (BSA Fracción V)	0,150 gr	Nevera a 4°C	Sigma A-9647
Piruvato Hep (2,2 mg/ml)*	0,5 ml	Congelador a -20°C	Sigma P-3662
Penicilina/estreptomicina*(1%)	0,5 ml	Congelador a -20°C	Sigma P- 4587; Sigma S-1277

\* Reactivo previamente preparado y alicuotado. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

3. Disolver los suplementos por agitación manual suave.
4. Medir el pH y corregirlo de ser necesario, en un rango de 7,3 a 7,4; con HCl 1M o NaOH 1M.
5. Filtrar en tubo cónico de 50 ml nuevo, debidamente marcado. Use un filtro de membrana de 0,2 µm.
6. Tapar bien, sellar con papel parafinado y almacenar en nevera a 4°C, máximo por una semana. Poner el tubo en la incubadora por lo menos durante 1 hora antes de su uso, con la tapa bien cerrada para estabilizar la temperatura.

## Medio para cultivo de células de la granulosa y oviductales *in vitro*.

### Para preparar 10 ml:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: medio de cultivo, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. En otro tubo cónico de 15 ml, poner 9 ml de medio M199 Sigma-4530.
3. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Piruvato MIV* (2,2 mg/ml)	100 µl	Congelador a -20°C	Sigma P-3662
Penicilina/estreptomicina* (1%)	100 µl	Congelador a -20°C	Sigma P- 4587; Sigma S-1277
Suero Fetal Bovino (SFB)	1000 µl	Congelador a -20°C	Gibco BRL 26140-079

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponde a la concentración final del medio.

4. Disolver por completo por agitación manual suave.
5. El pH debe estar entre 7,3 y 7,4. Con la adición de los suplementos y el CO<sub>2</sub> de la incubadora, el medio debe regular el pH. Tratar al máximo de no utilizar correctores de pH.



6. Filtrar en el tubo cónico de 15 ml marcado. Usar un filtro de membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .
7. Guardar el medio dentro de la incubadora, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo. La tapa del tubo debe estar un poco abierta para permitir la gasificación del medio. Este medio se debe preparar un día antes.

## Medio para cultivo de células oviductales *in vitro*

### Para preparar 10 ml:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: medio de cultivo, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y persona que lo preparó.
2. En otro tubo cónico de 15 ml, poner 9 ml de medio M199 Sigma-4530
3. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Piruvato MIV* (2,2 mg/ml)	100 $\mu\text{l}$	Congelador a $-20^{\circ}\text{C}$	Sigma P-3662
Penicilina/estreptomicina* (1%)	100 $\mu\text{l}$	Congelador a $-20^{\circ}\text{C}$	Sigma P- 4587; Sigma S-1277
Suero Fetal Bovino (SFB)	1000 $\mu\text{l}$	Congelador a $-20^{\circ}\text{C}$	Gibco BRL 26140-079

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

4. Disolver por completo por agitación manual suave.
5. El pH debe estar entre 7,3 y 7,4. Con la adición de los suplementos y el  $\text{CO}_2$  de la incubadora el medio debe regular el pH. Tratar al máximo de no utilizar correctores de pH.
6. Filtrar en el tubo cónico de 15 ml marcado. Usar un filtro de membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .
7. Guardar el medio dentro de la incubadora, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo. La tapa del tubo debe estar un poco abierta para permitir la gasificación del medio.

## Medio para cultivo de endometrio

Medio para el cultivo *in vitro* de células epiteliales endometriales (CEEP).

### Para preparar 50 ml de medio:

1. Marcar un tubo cónico de 50 ml así: medio de cultivo, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. En otro tubo de 50 ml, poner 50 ml de medio RPMI Sigma-1640

3. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Penicilina/estreptomicina* (1%)	500 µl	Congelador a -20°C	Sigma P; Sigma S
Suero Fetal Bovino (SFB)	5 ml	Congelador a -20°C	Gibco BRL 26140-079

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

- Disolver por completo por agitación manual suave.
- El pH debe estar entre 7,3 y 7,4. Con la adición de los suplementos y el CO<sub>2</sub> de la incubadora, el medio debe regular el pH. Tratar al máximo de no utilizar correctores de pH.
- Filtrar en el tubo cónico de 50 ml marcado. Usar un filtro de membrana de 0,2 µm.
- Guardar el medio dentro de la incubadora, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo. La tapa del tubo debe estar un poco abierta para permitir la gasificación del medio.

## Preparación de Hank's Balanced Salt Solution

Medio para el lavado de células epiteliales endometriales. Este medio regula el pH con la concentración de CO<sub>2</sub> ambiental, por tanto, no debe abrirse en incubadora y se puede trabajar largos periodos de tiempo en cabina de flujo laminar.

### Para preparar 15 ml de medio:

- En un tubo cónico de 15 ml agregue 15 ml de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution).
- Adicione los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Penicilina/estreptomicina* (1%)	150 µl	Congelador a -20°C	Sigma P; Sigma S
Suero Bovino Fetal (SBF)	1,5 ml	Congelador a -20°C	Gibco BRL 26140-079

\* Reactivo previamente preparado y alicuotado. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

- Medir el pH, que debe estar dentro del rango 7,3 a 7,4. De ser necesario, corregir el pH con HCl 1M o NaOH 1M.
- Filtrar en tubo cónico de 15 ml, nuevo debidamente marcado. Use un filtro de membrana de 0,2 µm



5. Tapar bien, sellar con papel parafinado y almacenar en nevera a 4°C, máximo por una semana. Póngalo en la incubadora por lo menos durante 1 hora antes de su uso con la tapa bien cerrada para estabilizar la temperatura.

## Solución hiposmótica para test de Host

Para preparar 50 ml de solución:

1. Marcar un tubo cónico de 50 ml así: solución hiposmótica, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Pesar en una balanza los siguientes reactivos y adicionarlos al tubo:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Citrato de Sodio	0,368 g	Temperatura ambiente	Merck 106448
Fructosa	0,676 g	Temperatura ambiente	Merck 104007

3. Completar con agua destilada hasta llegar a 50 ml y mezclar con vórtex.
4. Almacenar en nevera a 4°C.

## Solución de inducción de reacción acrosomal (MI)

Para preparar 4,5 ml de medio:

1. En un tubo cónico de 15 ml, poner 3,750 ml de medio de fertilización TL Modificado Stock.
2. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Penicilina/estreptomicina* (1%)	50 µl	Congelador de -20°C	Sigma P-4587; Sigma S-1277
Piruvato FIV* (2,2 mg/ml)	50 µl	Congelador de -20°C	SIGMA P-3362
PHE*	200 µl	Congelador de -20°C	Sigma-P; Sigma-H; Sigma-E
Heparina*	200 µl	Congelador de -20°C	Sigma
Suero Bovino Fetal (SFB)	250 µl	Congelador de -20°C	Gibco BRL 26140-079

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

3. Mezclar muy bien con agitación manual suave.
4. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: medio de inducción, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
5. Filtrar en este tubo cónico utilizando un filtro de membrana de 0,2 µm.
6. Guardar el medio en la incubadora, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo.

## Solución Talp Sperm Modificado (10x) para preparación de Percoll 90%

### Cloruro de potasio (KCl) 1M:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: KCl 1M, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Pesar 0,745 g de cloruro de potasio y ponerlos en otro tubo nuevo de 15 ml.
3. Adicionar 10 ml de agua destilada libre de pirógenos y mezclar con vórtex.
4. Filtrar con filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  en el tubo marcado y almacenar a temperatura ambiente.

### Fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1M:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y persona que preparó.
2. Pesar 0,0138 g de fosfato de sodio y ponerlos en un tubo de 15 ml nuevo.
3. Adicionar 10 ml de agua destilada libre de pirógenos y mezclar con vórtex.
4. Filtrar con filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  en el tubo marcado y almacenar a temperatura ambiente.

### Procedimiento:

#### Para preparar 10 ml de Talp Sperm 10X:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: TL Sperm Mod. 10X, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Poner 10 ml de agua destilada libre de pirógenos en un tubo cónico de 15 ml nuevo.
3. Adicionar 309  $\mu\text{l}$  de KCl 1M y 296  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M.
4. Adicionar 0,4675 g de cloruro de sodio y 0,238 g de HEPES.
5. Completar hasta 10 ml con agua destilada libre de pirógenos y mezclar con vórtex.
6. Ajustar el pH a 7,3, filtrar en el tubo marcado usando filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y almacenar en nevera a 4°C.

*Nota:* Utilizar los mismos reactivos usados en la preparación de medios para la producción de embriones bovinos *in vitro*.

## Percoll al 90% y 45%

### Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 0,1M:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: cloruro de magnesio 0,1 M, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.



2. Pesar 0,0203 g de cloruro de magnesio y ponerlos en un tubo cónico de 15 ml nuevo.
3. Adicionar 10 ml de agua destilada libre de pirógenos y mezclar con vórtex.
4. Filtrar con filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  en el tubo marcado y almacenar a temperatura ambiente.

#### **Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 1M:**

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: cloruro de calcio 1M, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Pesar 0,735 g de cloruro de sodio y ponerlos en un tubo cónico de 15 ml nuevo.
3. Adicionar 5 ml de agua destilada libre de pirógenos y mezclar con vórtex.
4. Filtrar con filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  en el tubo marcado y almacenar a temperatura ambiente.

#### **Procedimiento:**

Se debe tener mucho cuidado con la preparación del Percoll, siguiendo estrictamente los pasos aquí mencionados.

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: Percoll 90%, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Percoll	4,5 ml	Nevera de 4°C	Sigma P4937

3. Adicionar 0,5 ml de TL Sperm modificado 10X y mezclar con vórtex.
4. Adicionar 9,85  $\mu\text{l}$  de cloruro de calcio 1M y mezclar con vórtex.
5. Adicionar 19,7  $\mu\text{l}$  de cloruro de magnesio 0.1M y mezclar con vórtex.
6. Adicionar el siguiente reactivo, colocándolo lentamente en las paredes del tubo y evitando a toda costa que se vaya al fondo:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Ácido láctico 60%	18,4 $\mu\text{l}$	Nevera de 4°C	Sigma L7900

7. Mezclar muy bien con vórtex.
8. Adicionar 10,45 mg de bicarbonato de sodio SIGMA S-6014 y mezclar muy bien con vórtex.
9. Almacenar a 4°C.

10. Para preparar el Percoll a 45% se debe tomar la mitad de Percoll 90% de lo que se quiera preparar y adicionar la otra mitad con medio de fertilización de trabajo.

*Nota:* El Percoll no puede quedar con ningún tipo de precipitado, de ser así, se debe repetir el procedimiento por completo.

## Medio de maduración *in vitro*

Medio para maduración *in vitro* de embriones bovinos y cultivo de células de granulosa.

### Para preparar 5 ml:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: MIV, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Tomar 4,5 ml de medio M-199 SIGMA M-4530 en un tubo cónico nuevo de 15 ml y adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Suero Fetal Bovino (SBF)	0,5 ml	Congelador a -20°C	Gibco BRL 26140-079
Piruvato MIV* (2,2 mg/ml)	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P-5280
FSH* (10µg/ml)	20 µl	Congelador a -20°C	Sigma F-2293
LH* (5UI/ml)	5 µl	Congelador a -20°C	Primogonil Schering®
Penicilina/estreptomicina* (1%)	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P- 4587; Sigma S-1277

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

3. Disolver por completo por agitación manual suave.
4. El pH debe estar entre 7,3 y 7,4. Con la adición de los suplementos y el CO<sub>2</sub> de la incubadora, el medio debe regular el pH. Tratar al máximo de no utilizar correctores de pH.
5. Filtrar en el tubo cónico de 15 ml marcado. Usar un filtro de membrana de 0,2 µm.
6. Adicionar:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
17-βEstradiol* (1µg/ml)	5 µl	Congelador	Sigma E-8875

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

7. Guardar el medio dentro de la incubadora, mínimo dos horas antes de utilizarlo. La tapa del tubo debe estar un poco abierta para permitir la gasificación del medio.



## Medio de fertilización TL modificado stock

Es el medio base para fertilización *in vitro*. También se puede utilizar como base para la preparación del medio de inducción de la reacción acrosomal.

### Para preparar 50 ml de medio:

1. Marcar un tubo cónico de 50 ml en la tapa y el costado así: Fertilización Stock (FS), fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.

2. Pesar y adicionar los siguientes reactivos:

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de sodio	NaCl	0,335 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-5886
Cloruro de potasio	KCl	0,01175 gr	Temperatura ambiente	Sigma P-5405
Bicarbonato de sodio	NaHCO <sub>3</sub>	0,1052 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-6014
Fosfato de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0023 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-9638

3. Llevar exactamente hasta 50 ml con agua ultrapura SIGMA W-1503; agitar utilizando vórtex.

4. Adicionar:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
DL (Lactic Acid) (60% Syrup)	93 µl	Nevera a 4°C	Sigma L-7900
Rojo Fenol	50 µl	Temperatura ambiente	Sigma P-0290

5. Disolver por completo por agitación manual suave o vórtex y adicionar:

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0,015 gr	Temperatura ambiente	Sigma C-7902
Cloruro de magnesio	MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	0,005 gr	Temperatura ambiente	Sigma M-2393

6. Disolver por completo por agitación manual suave.
7. Medir el pH, que debe estar por encima de 7,0 color rosado. Incluir el resultado en el rotulado del tubo. No corregir. Con la adición de suplementos al medio de trabajo y el CO<sub>2</sub>, el pH se estabiliza sin necesidad de correctores.
8. Chequear la osmolaridad (debe estar en el rango de 280-300 mOsm).
9. Almacenar en nevera a 4°C, máximo por un mes.

## Medio de fertilización de trabajo (Fert)

Medio para coincubación de gametos, oocitos y espermatozoides durante la fertilización *in vitro*.

### Para preparar 5 ml:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: FIV, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Tomar 5 ml de medio de fertilización TL Modificado Stock en tubo cónico de 15 ml nuevo.
3. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Albúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA – FAF)	0,030 gr	Nevera a 4°C	Sigma A-6003
Piruvato FIV* (2,2 mg/ml)	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P-3662
Penicilina/estreptomicina* (1%)	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P- 4587; Sigma S-1277

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

4. Disolver por completo por agitación manual suave.
5. El pH debe estar entre 7,3 y 7,4. Con la adición de los suplementos y el CO<sub>2</sub> de la incubadora, el medio debe regular el pH. Tratar al máximo de no utilizar correctores de pH.
6. Filtrar en el tubo cónico de 15 ml marcado. Use un filtro de membrana de 0,2 µm.
7. Guardar el medio dentro de la incubadora, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo. La tapa del tubo debe estar un poco suelta para permitir la gasificación del medio. Este medio se debe preparar un día antes.
8. En el momento de la fertilización, suplementar los 5 ml de medio gasificado con los siguientes compuestos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
PHE*	200 µl	Congelador a -20°C	Sigma-P; Sigma-H; Sigma-E
Heparina*	200 µl	Congelador a -20°C	Sigma

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.



## Medio Talp Sperm Stock

Medio base para lavado de semen por gradiente de Percoll o swim up.

Para preparar 50 ml de medio:

1. Marcar un tubo cónico de 50 ml en la tapa y el costado, así: Talp Sperm Stock (TSpS), fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Pesar y adicionar los siguientes reactivos:

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de sodio	NaCl	0,290 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-5886
Cloruro de potasio	KCl	0,0120 gr	Temperatura ambiente	Sigma P-5405
Bicarbonato de sodio	NaHCO <sub>3</sub>	0,1045 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-6014
Fosfato de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0023 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-9638
HEPES		0,120 gr	Temperatura ambiente	Sigma H-9136

3. Llevar exactamente a 50 ml con agua ultrapura SIGMA W-1503, y agitar utilizando vórtex.
4. Adicionar estos compuestos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
DL (Lactic Acid) (60% syrup)	184 µl	Nevera a 4°C	Sigma L-7900
Rojo fenol	50 µl	Temperatura ambiente	Sigma P-0290

5. Disolver por completo por agitación manual suave o vórtex, y adicionar:

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0,0190gr	Temperatura ambiente	Sigma C-7902
Cloruro de magnesio	MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	0,0115gr	Temperatura ambiente	Sigma M-2393

6. Disolver por completo por agitación manual suave.
7. Medir el pH, el cual debe dar por encima de 7 color rosado, y escribir el resultado en el recipiente. No corregir. Con la adición de suplementos al medio de trabajo y el CO<sub>2</sub>, el pH se estabiliza sin necesidad de correctores.
8. Chequear la osmolaridad (debe estar en el rango de 280-300 mOsm).
9. Almacenar en nevera a 4°C, máximo por un mes.

## Medio Talp Sperm de trabajo

Medio base para lavado de semen por gradiente de Percoll o swim up.

### Para preparar 5 ml:

1. Marcar un tubo cónico de 15 ml así: TS, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Tomar 5 ml de medio Talp Sperm Stock (TSpS) en un tubo cónico de 15 ml nuevo.
3. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Albúmina de suero bovino (BSA Fracción V)	0,03 gr	Nevera a 4°C	Sigma A-9647
Piruvato FIV* (2,2 mg/ml)*	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P-3662
Penicilina/estreptomicina* (1%)	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P- 4587; Sigma S-1277

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

4. Disolver por completo por agitación manual suave.
5. El pH debe estar entre 7,3 y 7,4. Con la adición de los suplementos y el CO<sub>2</sub> de la incubadora, el medio debe regular el pH. Tratar al máximo de no utilizar correctores de pH.
6. Filtrar en el tubo cónico de 15 ml marcado. Usar un filtro de membrana de 0,2 µm.
7. Guardar el medio en la incubadora por lo menos durante 1 hora antes de su uso para estabilizar la temperatura, con la tapa bien cerrada.

## Medio de desarrollo CR1-AA Stock

Es el medio base para cultivo *in vitro* de embriones bovinos.

### Para preparar 50 ml de medio:

1. Marcar un tubo cónico de 50 ml en la tapa y el costado, así: CR1 Desarrollo Stock (CS), fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
2. Pesar y adicionar los siguientes reactivos:

Nombre	Fórmula	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Cloruro de sodio	NaCl	0,335 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-5886



Cloruro de potasio	KCl	0,01175 gr	Temperatura ambiente	Sigma P-5405
Bicarbonato de sodio	NaHCO <sub>3</sub>	0,1100 gr	Temperatura ambiente	Sigma S-6014
Glutamina		0,0075 gr	Temperatura ambiente	Sigma G-5763
Lactato		0,02750 gr	Nevera a 4°C	Sigma L-4388

- Llevar a exactamente a 50 ml con agua ultrapura SIGMA W-1503 agitar utilizando vórtex.
- Adicionar:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Rojo fenol	50 µl	Temperatura ambiente	Sigma P-0290

- Disolver por completo por agitación manual suave.
- Remover 1,5 ml de la solución con la micropipeta de 1000 µl.
- Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
100X MEM aminoácidos no esenciales	500 µl	Nevera a 4°C	Sigma M- 7145
50X BME aminoácidos esenciales	1 ml	Nevera a 4°C	Sigma B- 6766

- Disolver por completo por agitación manual suave.
- Medir el pH, que debe estar por encima de 7 color rosado, y escribir el resultado en el recipiente. No corregir. Con la adición de suplementos al medio de trabajo y el CO<sub>2</sub>, el pH se estabiliza sin necesidad de correctores.
- Chequear la osmolaridad (debe estar en el rango de 280-300 mOsm).
- Almacenar en nevera a 4°C, máximo por un mes.

## Medio de desarrollo CR1-AA de trabajo

Medio para cultivo *in vitro* de embriones bovinos. Cumple con los requerimientos para el desarrollo embrionario temprano hasta la etapa de eclosión.

### Para preparar 5 ml:

- Marcar un tubo cónico de 15 ml así: CIV, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y persona que lo preparó.
- Tomar 5 ml de medio CR1 Desarrollo Stock en un tubo cónico de 15 ml nuevo.
- Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Albúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA – FAF)	0,015 gr	Nevera a 4°C	Sigma A-6003
Piruvato CIV* (4,4 mg/ml)	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P-3662
Penicilina/estreptomicina* (1%)	50 µl	Congelador a -20°C	Sigma P; Sigma S
Suero Fetal Bovino (SBF)	250 µl	Congelador a -20°C	Gibco BRL 26140-079

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

- Disolver por completo por agitación manual suave.
- El pH debe estar entre 7,3 y 7,4. Con la adición de los suplementos y el CO<sub>2</sub> de la incubadora, el medio debe regular el pH. Trate al máximo de no utilizar correctores de pH.
- Filtrar en el tubo cónico de 15 ml marcado. Usar un filtro de membrana de 0,2 µm.
- Guardar el medio dentro de la incubadora, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo. La tapa del tubo debe estar un poco abierta para permitir la gasificación del medio.

## Preparación de colorantes utilizados en la evaluación de embriones y semen

### Solución Giemsa

Este colorante está compuesto por eosina y azul de metileno. La eosina es un componente ácido y con carga negativa, que colorea el componente extracelular. El azul de metileno es un componente básico y con carga positiva, que tiene afinidad por los ácidos nucleicos. La técnica se basa en la disociación controlada de las sales de eosina que ocurre al solubilizar la mezcla del Giemsa por disolución en H<sub>2</sub>O destilada.

#### Procedimiento:

- Marcar un tubo cónico de 15 ml así: solución Giemsa de trabajo, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
- Adicionar el siguiente reactivo:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa en solución	3 ml	Temperatura ambiente	Merck 109204500

- Adicionar agua destilada hasta llegar a 15 ml y mezclar con vórtex.
- No almacenar la solución; siempre se debe utilizar solución preparada el mismo día.



## Solución eosina nigrosina

Para preparar 100 ml de solución:

1. En un beacker de 100 ml colocar 80 ml de PBS.
2. Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Eosina Y	0,5 g	Temperatura ambiente	Sigma E6003
Nigrosina	10 g	Temperatura ambiente	Sigma N4754

3. Agregar la eosina Y, y disolver por agitación suave utilizando un magneto y una plancha térmica a 70°C.
4. Agregar 10 g de nigrosina y continuar agitando hasta que esta se disuelva por completo.
5. Retirar de la plancha y dejarla enfriar a temperatura ambiente.
6. Filtrar en tubos cónicos de 15 ml usando papel filtro. Marcar como tinción (eosina 0,5% - nigrosina 10%), fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable.
7. Almacenar a 4°C.

## Solución de la tinción PISUM - FITC

Solución colorante fluorescente para evaluación de reacción acrosomal.

### Precauciones:

Al trabajar con colorantes fluorescentes, en todo momento se debe usar bata de laboratorio, guantes y mascarilla, debido a que dichos colorantes poseen características mutagénicas y carcinogénicas.

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

1. Preparar 10 ml de PBS 1X, ajustar su pH a 6.8 y esterilizarlo por autoclave.
2. En un tubo cónico de 15 ml, recubierto con papel aluminio, disolver 2 mg de Lectina de Pisum sativum conjugada con FITC (Sigma L0770) con 2 ml del PBS preparado anteriormente. Concentración final de la solución: 1 mg/ml.
3. Disolver completamente por agitación utilizando vórtex.
4. Hacer alícuotas de 50 µl de la solución anterior en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml recubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz y almacenar a -20°C.
5. Para la solución de trabajo, adicionar a uno de los tubos anteriores 950 µl de PBS a pH 6,8.

6. Por cada lámina a teñir, utilizar 50 µl del colorante. Si de la alícuota de trabajo aún queda colorante, se puede almacenar nuevamente a -20°C.
7. Se recomienda preparar cada alícuota de trabajo según la demanda, en lugar de prepararlas todas a la vez.

## Solución Hoechst 33342 (10 µg/ml) para tinción de oocitos y embriones (SIGMA B2261)

1. Preparar la siguiente solución de dilución para el fluorocromo:
  - a. 750 µl de citrato de sodio al 2,3% (para preparar el citrato de sodio, pesar 345 mg y diluir en 15 ml de agua tridestilada).
  - b. 250 µl de etanol (100%).
2. Preparar una solución Stock de Hoechst tomando un miligramo del reactivo y diluirlo en 1 ml de la solución de dilución. Marcar como solución Stock (1 mg/ml).

Para preparar la solución de trabajo (10 µg/ml), realizar la siguiente dilución:

Citrato de sodio (2,3%):	750 µl
Etanol (100%):	250 µl
Hoechst (Solución Stock):	10 µl

3. Hacer alícuotas en tubos para microcentrífuga de 0,6 ml y marcar como Hoechst – solución de trabajo.

## Ioduro de propidio

- Para preparar la solución stock, pesar 5 mg de Ioduro de propidio SIGMA P-4170 y disolverlo en 1ml de PBS.
- Almacenar a -20°C en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml protegidos de la luz.
- Para preparar 1 ml de la solución de trabajo, tomar 10 µl de la solución stock (5 mg/ml), diluirla en 990 µl de PBS en un tubo de microcentrífuga y protegerlo de la luz.

## Solución naranja de acridina para celularidad

Para preparar la solución stock, pesar 0,1 mg de naranja de acridina y disolverlo en 1 ml de PBS. Mantenerlo protegido de la luz y congelado a -20°C.

Para preparar la solución de trabajo, tomar la cantidad necesaria de la solución stock 0,1 mg/ml y disolverla en 1 ml de cualquier medio (como MIV, FIV o CIV) sin SFB ni albúmina. Usualmente se emplea una concentración final de 5 µM.



## Solución de tinción JC-1

Solución colorante fluorescente para evaluar el potencial de la membrana mitocondrial.

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

- En un tubo cónico de 15 ml, recubierto con papel aluminio, disolver 1 mg de JC-1 (molecular probes T-3168) en 10 ml del DMSO.
- Disolver completamente por agitación utilizando vórtex.
- Hacer alícuotas de 1 ml de la solución anterior en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml recubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz y almacenar a -20°C.
- Preparar una dilución de la solución anterior diluyendo 100 µl en 900 µl de DMSO.
- Hacer alícuotas de 50 µl en tubos de microcentrífuga de 0,6 ml cubiertos con papel aluminio y almacenar a -20°C.

## Solución Z-VAC-FMK

Solución colorante fluorescente para evaluar la actividad de las caspasas.

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

- En un tubo cónico de 15 ml, recubierto con papel aluminio, disolver 1 mg de Z-VAD-FMK (BD Pharmingen 550377) en 10 ml del DMSO.
- Disolver completamente por agitación utilizando vórtex.
- Hacer alícuotas de 1 ml de la solución anterior en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml recubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz y almacenar a -20°C.
- Preparar una dilución de la solución anterior diluyendo 100 µl en 900 µl de DMSO.
- Hacer alícuotas de 50 µl en tubos de microcentrífuga de 0,2 ml cubiertos con papel aluminio y almacenar a -20°C.

## Solución Acridine Orange (AO) – Ethidium Bromide (EB) (AO/EB)

Solución colorante fluorescente para evaluación de apoptosis.

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

- Preparación de naranja de acridina (AO): disolver 5 mg en 1 ml de PBS.
- Preparación de bromuro de etidio (EB): disolver 3 mg en 1 ml de PBS.
- Preparación de la solución AO/EB: diluir 1 µl de solución de AO y 1 µl de solución EB en 1 ml de PBS. Cubrir con papel aluminio.
- Almacenar a 5°C por un periodo máximo de 2 semanas.

## **Solución fosfato salina suplementada con polivinil pirrolidona (PBS + PVP 0,025%)**

Es un medio empleado para el lavado de embriones durante los protocolos de tinción. Es ideal por su capacidad de mantener los embriones en estado de suspensión, evitando su fijación en las superficies de los implementos de trabajo.

### **Para preparar 100 ml:**

1. Tomar un beaker estéril y depositar 100 ml de PBS libre de calcio y magnesio.
2. Pesar 25 mg de PVP y diluirlos en el PBS para obtener una concentración final de 0,025% PVP. Emplear vórtex para asegurar la dilución de los componentes.
3. Hacer alícuotas de la dilución en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml, debidamente marcados: nombre del reactivo, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y nombre del responsable. Es posible guardar un volumen mayor en un tubo cónico de 50 ml como stock para ser alícuotado una vez se agoten las alícuotas de 1,5 ml.

*Nota:* Los volúmenes menores en alícuotas de trabajo disminuyen el riesgo de contaminación.

4. Almacenar en nevera a 4°C hasta el momento de su uso.

## **Solución de paraformaldehído al 4% (%m/v)**

Medio empleado para la fijación celular en embriones sometidos a protocolos de tinción.

*Nota:* Se recomienda preparar alícuotas de bajo volumen debido a la inestabilidad del reactivo una vez diluido, además de las bajas cantidades empleadas en cada proceso (50µl por cada 10 embriones).

### **Para preparar 1 ml:**

1. Pesar 40 mg de paraformaldehído (Merck® 818715) y depositarlos en un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml, debidamente marcado (nombre del reactivo, fecha y nombre de la persona encargada de su preparación).
2. Adicionar 1 ml de PBS + 0,025% PVP y realizar pipeteo o, en su defecto, llevar a vórtex para agilizar la dilución.
3. Llevar el tubo con la dilución a un baño de María a 65°C por 2 horas. Finalizado el tiempo, verificar la total dilución de los componentes. Emplear papel de cera para cubrir la tapa y almacenar a 4°C hasta el momento de su uso.

*Nota:* La solución de paraformaldehído almacenada a 4°C es estable por 2 semanas.



## **Solución de tritón X-100 al 0,5% (V/V) y citrato de sodio al 0,1% (W/v)**

**Para preparar 15 ml:**

1. Tomar 75  $\mu$ l de solución de tritón X-100 y ubicarlos en un tubo cónico de 15 ml.
2. Pesar 15 mg de citrato de sodio y ubicarlos en un tubo cónico de 15 ml.
3. Completar el volumen del tubo cónico hasta 15 ml con PBS.
4. Marcar el tubo y almacenar en nevera de 4°C.

## **Buffer de equilibrio (stock del kit de 9,6 ml)**

Es empleado para preparar los embriones para la reacción de túnel, así como para la dilución de los fluorocromos y las enzimas empleadas para la técnica.

1. Descongelar y mantener en nevera con hielo (evitar cambio brusco de temperatura).
2. Verificar su descongelación total antes de su uso, y agitar.
3. Alicuotar volúmenes de 150  $\mu$ l en tubos para microcentrífuga de 0,5 ml. Mantener entre 10 a 20 alícuotas listas para su uso.
4. Marcar las alícuotas con el nombre del reactivo, la cantidad y la fecha de preparación.
5. Almacenar en nevera de -20°C.
6. Al momento de su uso, descongelar en nevera con hielo y mantener ahí durante el protocolo.

## **Enzima rTDT –Deoxinucleotidil terminal transferasa recombinante– (stock inicial de 20 $\mu$ l)**

1. Garantizar condiciones de oscuridad durante la manipulación de este reactivo.
2. Sacar un stock de 20  $\mu$ l (debe haber 3 alícuotas para un total de 60  $\mu$ l en el kit).
3. Descongelar en nevera con hielo para evitar cambios bruscos de temperatura.
4. Cubrir los eppendorf de 0,2 ml con papel aluminio y marcar con el nombre, el volumen y la fecha. Ponerlos en la nevera con hielo.
5. Llevar el volumen del stock a alícuotas de 5  $\mu$ l en eppendorf de 0,2 ml (4 alícuotas iniciales).
6. Almacenar en nevera de -20°C dentro de un recipiente cubierto con papel aluminio, el cual debe llevar un mensaje de precaución para evitar que se sea abierto.

## Nucleótidos dUTPs (stock del kit de 50 $\mu$ L)

Este reactivo hace parte del kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System

1. Garantizar condiciones de oscuridad durante la manipulación de este reactivo.
2. Sacar un stock de 50  $\mu$ l (debe haber 6 alícuotas para un total de 300  $\mu$ l en el kit).
3. Descongelar en nevera con hielo para evitar cambios bruscos de temperatura.
4. Cubrir los eppendorf de 0,2 ml con papel aluminio y marcar con el nombre, el volumen y la fecha. Ponerlos en la nevera con hielo.
5. Llevar el volumen del stock a alícuotas de 10  $\mu$ l en eppendorf de 0,2 ml (5 alícuotas iniciales).
6. Almacenar en nevera de  $-20^{\circ}\text{C}$  dentro de un recipiente cubierto con papel aluminio, el cual debe llevar un mensaje de precaución para evitar que se sea abierto

## Preparación del mix de reacción

Durante el proceso de túnel se deberá elaborar el siguiente mix (cantidad para 10 embriones).

1. Tomar un tubo para microcentrífuga de 0,5 ml, cubrir con papel aluminio y mantener en nevera con hielo.
2. Adicionar los siguientes componentes:

Buffer de equilibrio	45 $\mu$ l
Mix dUTPs	5 $\mu$ l
Enzima rTDT	1 $\mu$ l

3. Mantener a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

## SSC 2X (preparar un stock de trabajo de 10 ml)

Es empleado para detener la reacción enzimática de la rTDT con el objetivo de continuar con la técnica de túnel.

1. Diluir 1 ml de SSC 20X en 10ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y agitar con vórtex.
2. Alicuotar en volúmenes de 200  $\mu$ l y marcar con el nombre, la fecha y el volumen (5 alícuotas iniciales).
3. Almacenar el stock de trabajo y las alícuotas a temperatura ambiente. Cubrir con parafilm para evitar su evaporación.



# Preparación de reactivos utilizados en la técnica para sexaje de embriones

## Solución pronasa 0,5%

Pesar 0,5 gr de pronasa (P8811 de Sigma) y diluirlo en 100 ml de PBS (solución salina buferada fosfatada), alicuotar en tubos de microcentrífuga de 1 ml y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por tiempo indefinido.

## Activación de buffer de lisis RTL plus:

Este buffer viene en conjunto con el All Prep DNA/RNA Microkit (Cat # 80284) de Qiagen®. Para su activación, agregar 10  $\mu\text{l}$  -Mercapto Etanol por cada ml de buffer RTL plus.

*Nota:* En caso de no tener este buffer se trabaja con el buffer ATL incluido en el kit Dneasy Blood & Tissue® de Qiagen empleado para los procesos de extracción del DNA.

## Medio PBS con poli vinil pirrolidona (PVP) al 0,3% para sexaje de embriones.

Para preparar 100 ml, pesar 0,3 g de PVP y diluirlos en 100 ml de PBS en un recipiente estéril.

## Solución EDTA

El EDTA atrapa los iones de magnesio y de esta forma evita que las enzimas DNAsas degraden el DNA. Este, a una concentración de 0,5 M y un pH de 8, constituye uno de los reactivos empleados en el buffer TAE para la electroforesis.

Partiendo del peso molecular del EDTA: 372,24 g/mol, se calcula la cantidad en gramos que se necesitan para pesar un volumen de 500 ml; este valor sería:

## Solución de buffer TAE para la electroforesis en gel de agarosa

Este buffer se emplea para la separación de ácidos nucleicos como el DNA y RNA.

### Para preparar 1 litro de buffer:

1. En un erlenmeyer estéril de 500 ml agregar los siguientes reactivos:

Nombre	Cantidad	Ubicación
Tris Base	48,4 g	Temperatura ambiente
Ácido acético glacial	11,42 ml	Temperatura ambiente
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)*	20 ml	Temperatura ambiente

\* Se debe preparar a una concentración de 0,5M, con pH 8.

- Adicionar agua destilada, desionizada, estéril y dejar en agitación durante 12 horas.
- Tapar bien y almacenar a temperatura ambiente.

## Preparación de medios utilizados en la criopreservación de células reproductivas y embriones bovinos.

### Medios para vitrificación de embriones bovinos

#### Medio de mantenimiento para embriones bovinos.

##### Para preparar 5 ml de medio:

- Marcar un tubo cónico de 15 ml así: medio de mantenimiento, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y persona que lo preparó.
- Tomar 4 ml de TCM199 buferado con HEPES.
- Adicionar el siguiente suplemento:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Suero fetal bovino (SFB)*	1 ml	Congelador a -20°C	Gibco BRL 26140-079

\* Reactivos previamente preparados y alicuotados. Las concentraciones señaladas corresponden a la concentración final del medio.

- Disolver por completo por agitación manual suave.
- Filtrar en tubo cónico de 15 ml nuevo, debidamente marcado. Usar un filtro de membrana de 0,2 µm.
- Guardar el medio dentro de la incubadora, bien tapado, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo.

### Solución de vitrificación 1 (SV1) de embriones bovinos

- En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml debidamente rotulado, poner 800 µl de medio de mantenimiento



- Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Etilenglicol	100 µl	Temperatura ambiente	Sigma E9129
Dimetilsulfóxido	100 µl	Temperatura ambiente	Sigma D2650

- Agitar suavemente de forma manual y guardar en la incubadora bien tapado.

## Solución de vitrificación 2 (SV2) de embriones bovinos

- En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml debidamente rotulado, poner 600 µl de medio de mantenimiento.
- Adicionar los siguientes suplementos:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Etilenglicol	200 µl	Temperatura ambiente	Sigma E9129
Dimetilsulfóxido	200 µl	Temperatura ambiente	Sigma D2650

- Agitar suavemente de forma manual y guardar en la incubadora bien tapado.

## Solución de sucrosa (MS)

Para preparar 50 ml de medio:

- En un tubo cónico de 50 ml tomar 45 ml de TCM199 buferado con HEPES.
- Adicionar el siguiente suplemento:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Sucrosa	17,115 gr	Temperatura ambiente	Amresco 0335

- Disolver por completo y mezclar con vórtex.
- Adicionar TCM199 buferado con HEPES hasta llevar a 60 ml, y mezclar de nuevo.
- Marcar un tubo cónico de 50 ml así: medio sucrosa, fecha de elaboración (dd/mm/aa) y persona que lo preparó.
- Tomar 40 ml del medio en el tubo de 50 ml y adicionar el siguiente suplemento:

Nombre	Cantidad	Ubicación	Marca y referencia
Suero fetal bovino (SFB)*	10 ml	Congelador a -20°C	Gibco BRL 26140-079

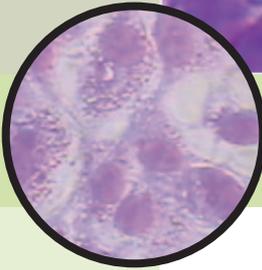
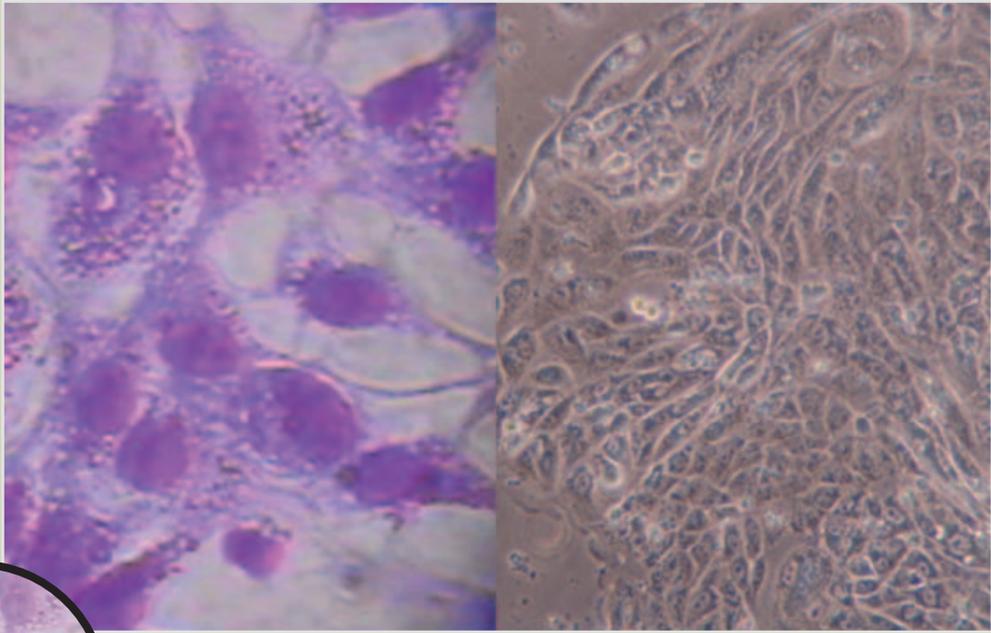
- Filtrar en un tubo nuevo debidamente rotulado. Use un filtro de membrana de 0,2 µm.

8. Guardar el medio dentro de la incubadora, bien tapado, mínimo durante dos horas antes de utilizarlo.

### Soluciones de calentamiento M1, M2 y M3

En tubos de microcentrífuga de 1,5 ml debidamente rotulados para cada medio, realizar las siguientes mezclas:

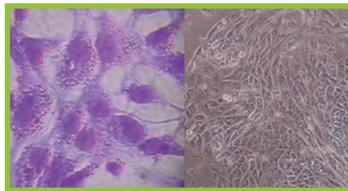
Nombre	Tubo	Medio de Mantenimiento (MM) (Ver medios de vitrificación de embriones)	Medio Sucrosa (MS)
M1	1	800 µl	400 µl
M2	2	800 µl	200 µl
M3	3	800 µl	No requiere



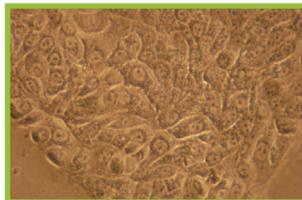
## Capítulo 3

### Cultivo de células del tracto reproductivo de la hembra bovina

Autores: Ángela Patricia López Cardona, Ariel Marcel Tarazona Morales, Carlos Andrés Giraldo Echeverri Yasser Yohan Lenis Sanín, Carolina Mesa Pineda y Martha Olivera Ángel.



Células de la granulosa bovina



Células oviductales bovinas



Células epiteliales endometriales bovinas

El estudio de la fisiología reproductiva de la hembra bovina ha sido una importante área de desempeño del Grupo de Investigación Biogénesis. Las características geográficas y climáticas del contexto colombiano han permitido establecer ganados *Bos indicus*, sus cruces con *Bos taurus* y el ganado criollo colombiano, con un comportamiento reproductivo propio del trópico y con algunas particularidades si se compara con los reportes de los países con estaciones. Con la implementación de la ultrasonografía transrectal, fue posible describir las dinámicas foliculares de las vacas, principalmente del ganado cebuino y blanco orejinegro. Luego comenzamos a enfatizar la línea de investigación en torno al anestro posparto —un momento crítico para los ganaderos desde el punto de vista de eficiencia económica.

Una vez logramos realizar importantes aproximaciones a la fisiología de esta etapa, como la caracterización de las ondas foliculares durante el ciclo estral y durante el anestro posparto, el papel del manejo del amamantamiento en el acortamiento del período abierto, la relación de la condición corporal con el reinicio de la actividad reproductiva posparto, el papel del cuerpo lúteo y la producción de progesterona en el reconocimiento materno embrionario, nuevas preguntas fueron surgiendo como interesantes hipótesis asociadas con nutrición (leptina y ácidos grasos), fisiología endometrial (prostaglandinas e interferón tau) y fisiología ovárica (luteinización), lo cual nos llevó a estandarizar cultivos primarios de las células asociadas a estos fenómenos.

A continuación se presentan los protocolos para el cultivo de células de la granulosa y su proceso de luteinización, de células endometriales y células oviductales. La bibliografía asociada con los experimentos para el uso de estas líneas con respecto a procesos fisiológicos, como luteinización, luteólisis, reconocimiento materno embrionario y cocultivo con embriones, se encuentra al final de este capítulo.

## Procedimientos para el cultivo de células de granulosa bovina

### Toma de muestras: recolección de ovarios

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para recolectar y transportar ovarios desde la planta de beneficio hasta el laboratorio.
- **Materiales:** Termo de boca ancha, tijeras curvas, guantes de látex, termómetro y bolsas resellables.
- **Indumentaria:** Trabajo en planta de beneficio para toma de muestras (ver capítulo 1).
- **Medio:** 500 ml de solución salina (NaCl 0,9%) (ver capítulo 2).



### Procedimiento:

- Llenar  $\frac{3}{4}$  partes del termo con hielo para mantener una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  durante la recolección.
- Verter 100 ml de solución salina (NaCl 0,9%) en una bolsa resellable, e introducirla en el termo.
- Recolectar los ovarios del tracto reproductivo con tijeras curvas (ver figura 3.1). Retirar la mayor cantidad de tejido posible dejando solo el ovario; lavarlos con agua fría y depositarlos dentro de la bolsa. Cerrar y tapar el termo. Repetir este paso hasta obtener la cantidad deseada de ovarios.
- Al finalizar la colecta, sacar del termo la bolsa con los ovarios, y retirar con cuidado la solución salina sucia.
- Lavar dos veces los ovarios con 100 ml de solución salina limpia a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , para retirar la mayor cantidad de sangre posible.
- Verter 200 ml de solución salina a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  (suficiente para cubrir los ovarios), cerrar muy bien la bolsa asegurándose de que quede la menor cantidad de aire posible, y que no haya escapes.
- Cambiar el hielo del termo e introducir la bolsa con los ovarios ya lavados. Verificar la temperatura y la hora de salida, cerrar muy bien el termo y transportar los ovarios hasta el laboratorio.

*Nota:* El tiempo máximo desde el inicio de la recolección de ovarios hasta la llegada al laboratorio no debe superar las tres horas.



**Figura 3.1.** Separación de ovario del tracto reproductivo.

## Obtención de células de la granulosa bovina

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para obtener células de la granulosa bovina.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos, tubos cónicos de 15 ml, jeringas de 10 ml, jeringas de 5 o 10 ml de tres piezas, gasa, agujas hipodérmicas de 18 Gx11/2.
- **Medios:** Solución salina buferada fosfatada pH 7,3 (PBS) y medio para cultivo de células de granulosa (ver capítulo 2).
- **Equipos:** Centrífuga, incubadora de CO<sub>2</sub>, micropipetas de 100 µl y 1000 µl, y vórtex.

### Procedimiento:

- Para la obtención de fluido folicular (FF), refiérase al procedimiento “Aspiración ovárica” (ver capítulo 5).
- Centrifugar los tubos de cónicos de 15 ml con el FF aspirado a 290 gravedades por cinco minutos.
- Realizar dos lavados con PBS, de la siguiente manera: retirar el FF sin retirar el pellet celular del fondo del tubo, adicionar 10 ml de PBS atemperado a 37°C, resuspender el pellet celular y centrifugar nuevamente a 290 gravedades por cinco minutos (repetir este paso).
- Para finalizar el lavado, retirar el PBS del segundo lavado y adicionar 10 ml de medio de cultivo para células de granulosa atemperado a 37°C, y centrifugar nuevamente a 290 gravedades por cinco minutos.
- Después de la última centrifugación, retirar la mayor cantidad de medio posible y resuspender el pellet celular en 5 ml de medio nuevo (ver figura 3.2).

## Cultivo de células de la granulosa bovina

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para el cultivo de células de la granulosa bovina.
- **Materiales:** Cajas de 24 pozos, pinzas con garra estériles, laminillas redondas estériles, tubos para microcentrífuga de 0,2 ml, 0,5 ml y 1,5 ml.
- **Medios:** Medio para cultivo de células de granulosa (ver capítulo 2), ácido acético glaciado (3%)
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, incubadora de CO<sub>2</sub>, cámara de Neubauer, vórtex, microscopio óptico, micropipetas de 100 µl y 1000 µl.

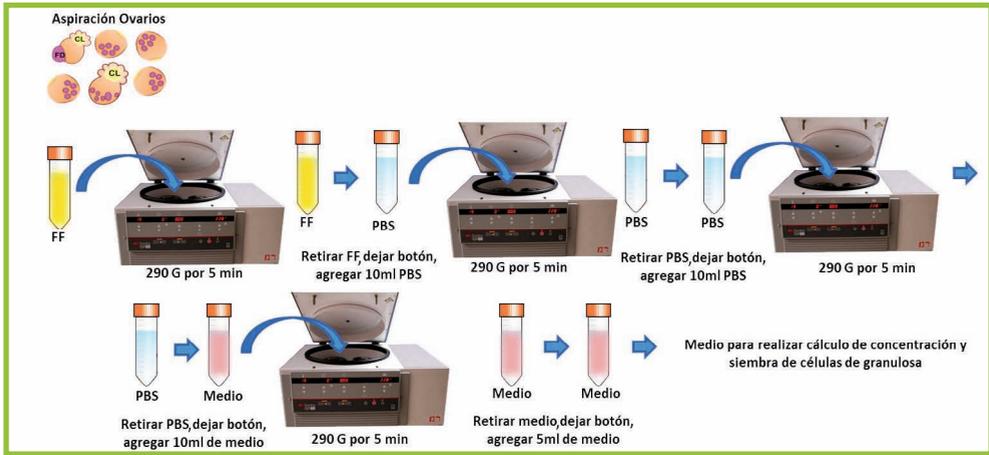


Figura 3.2. Diagrama para la obtención de células de granulosa bovinas.

#### Procedimiento:

*Nota:* Es necesario determinar la concentración celular en cámara de Neubauer (procedimiento similar al conteo de células espermáticas en el capítulo 4), y realizar la dilución de células con ácido acético glacial (para lisar los glóbulos rojos y evitar contarlos), de la siguiente manera: a) homogenizar por vórtex los 5 ml de medio que contienen las células de granulosa recuperadas durante 30 segundos; b) tomar un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml y adicionar 10  $\mu$ l del medio de cultivo donde se encuentran resuspendidas las células de la granulosa más 190  $\mu$ l de ácido acético glacial al 3%; c) cargar cada microcámara con 10  $\mu$ l de la dilución anterior y realizar el conteo. El promedio de ambas cámaras se debe multiplicar por  $5 \times 10 \times 1000 \times 20$  (factor de dilución). El valor final será expresado en millones de células por ml de medio de cultivo recuperado en la última centrifugación.

- Marcar la caja de 24 pozos con la fecha, el código del cultivo de células de granulosa bovinas y el nombre del responsable, asegurándose de abrirla sólo dentro de la cabina de flujo laminar.

Es recomendable colocar una laminilla redonda estéril en el fondo de cada pozo para que las células se adhieran a ella, y luego se puedan retirar para análisis de morfología.

- Calcular la siembra para una concentración final de 3.000.000 células/ml. De acuerdo a la concentración hallada en la cámara de Neubauer, añade el volumen necesario para completar 1000  $\mu$ l por pozo. Al momento de sembrar en los pozos, tener en cuenta el siguiente orden: adicionar primero el medio para ajustar el volumen, y luego el volumen de medio con las células. Homogenizar delicadamente por pipeteo.

- Incubar a 37,5°C, 5% de CO<sub>2</sub>, y humedad relativa del 90%.

*Nota:* El tiempo máximo desde el inicio del procedimiento hasta la incubación no debe superar las seis horas.

- Realizar cambio total de medio a las 48 horas.

Las células permanecen por 96 horas en cultivo. Cada 24 horas se debe evaluar el aspecto morfológico de las células en el microscopio invertido. Aproximadamente durante las primeras 48 horas de cultivo, la morfología de las células de granulosa es redondeada, ellas flotan en el medio de cultivo (ver figura 3.3), y su esteroidogénesis es hacia la producción de estrógenos. Luego ocurren cambios tanto morfológicos (células fibroblastoides, adheridas a la placa) como funcionales (esteroidogénesis hacia producción de progesterona), que indican que las células están iniciando un proceso de luteinización *in vitro*, por tanto, se debe hablar de células de granulosa luteinizadas entre las 48 y 96 horas de cultivo.

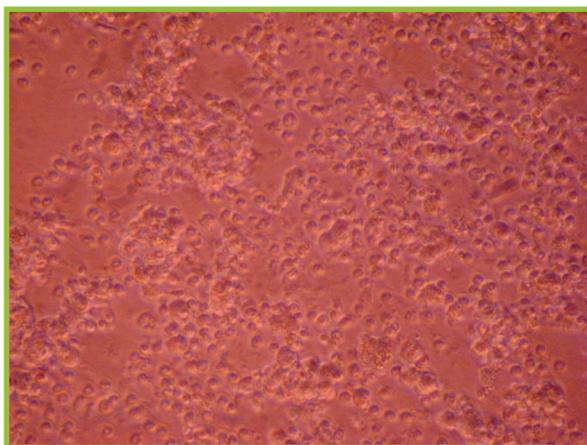


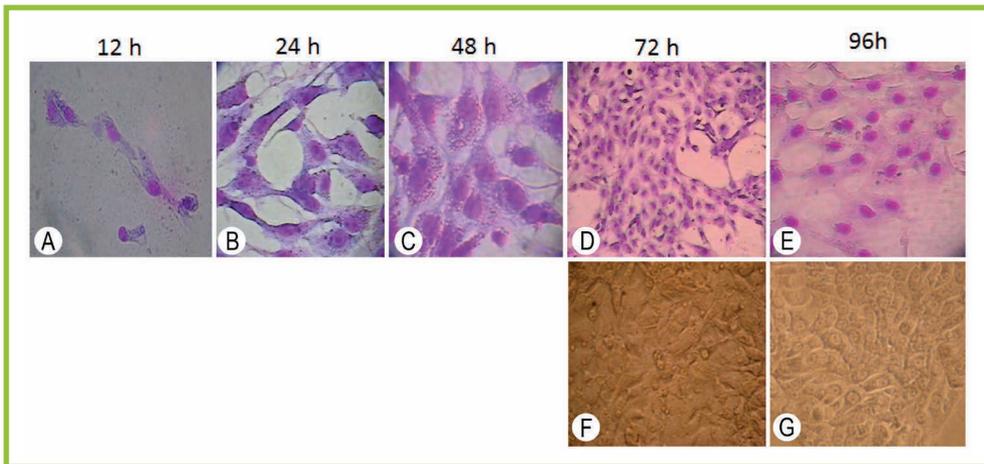
Figura 3.3. Células de granulosa en cultivo a las 0 horas.

### Características del cultivo de células de granulosa bovinas

- **Propósito:** Indicar las características del cultivo de células de granulosa bovinas y los cambios de morfología durante el cultivo.
- **Materiales:** Cajas de cultivo de 24 pozos.
- **Equipos:** Incubadora de CO<sub>2</sub>, microscopio óptico y microscopio invertido de contraste de fase.
- **Descripción:** Las laminillas redondas del fondo del plato se retiran y se realizan las tinciones para morfología colocándolas sobre una lámina portaobjetos. Entre



las 12 y las 24 horas de cultivo, las células comienzan el proceso de adherencia al plato de cultivo (ver figura 3.4 A), además, se observan pequeños grupos de células que comienzan a unirse (ver figura 3.4 B). A partir de las 48 horas, la granulosidad de las células en su citoplasma es evidente con coloración de hematoxilina/eosina (de allí su nombre) (ver figura 3.4. C). Después de 72 horas de cultivo es evidente el alargamiento del citoplasma, lo que caracteriza el inicio de la formación de la monocapa, la cual ocupa la totalidad del plato de cultivo a las 96 horas (ver figuras 3.4 D y E), y puede ser evaluada con microscopía de contraste de fase para observar las viabilidad del cultivo horas (ver figuras 3.4 F y G).



**Figura 3.4.** Morfología y cinética de las células de la granulosa bovina en cultivo a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas. A-E: Tinción de hematoxilina/eosina, F-G: evaluación de monocapas de granulosa. A: inicio de adherencia al plato de cultivo; B: agrupación de células de la granulosa; C: gránulos en el citoplasma; D-E: formación de monocapa; F-G: evaluación de viabilidad del cultivo en microscopio de contraste de fases.

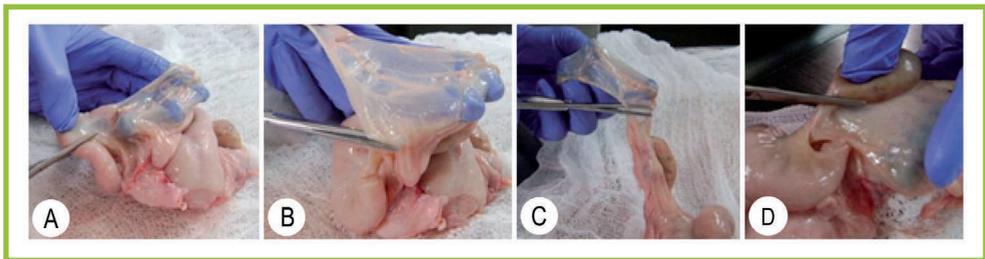
## Procedimientos para el cultivo de células de oviducto bovinas

### Toma de muestras: Recolección de oviductos

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para recolectar y transportar oviductos bovinos desde la planta de beneficio hasta el laboratorio.
- **Materiales:** Termo de boca ancha, tijeras curvas estériles, guantes de nitrilo estériles, termómetro, tubos cónicos de 50 ml, hielo.
- **Indumentaria:** Planta de beneficio local para toma de muestras (ver capítulo 1).
- **Medios:** 500 ml de solución salina (NaCl 0,9%) (ver capítulo 2).

### Procedimiento:

- Llenar un tubo cónico de 50 ml con 15 ml de solución salina (NaCl 0,9%), atemperada a 4°C en el termo con hielo.
- Seleccionar úteros de animales con condición corporal mayor de 3,0 (en escala de 1,0 a 5,0). No incluya úteros gestantes. En caso de que el cultivo de células oviductales sea para realizar cocultivo con embriones, es preferible colectarlas de tractos que presenten un ovario o con folículo preovulatorio (terciario) o cuerpo hemorrágico.
- Separar el oviducto cortando con las tijeras estériles 5 cm antes de la unión útero-tubal (istmo), continuando por todo el mesosalpinx y la bolsa ovárica, y teniendo la precaución de incluir el menor tejido adiposo posible (ver figura 3.5 B). Puede dejar incluido el ovario que corresponde a cada oviducto, en caso de necesitarlos para otros cultivos (ver figura 3.5 C).
- Depositar en el tubo los oviductos con solución salina, y procurar que siempre se encuentren sumergidos en esta.
- Transportar el tubo con los oviductos en el termo con hielo a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.



**Figura 3.5.** Separación de oviductos de piezas reproductivas bovinas. A. Ubicación del oviducto y del mesosalpinx, corte en la unión útero-tubárica; B-C. Corte del mesosalpinx con el oviducto; D. Corte del ovario.

### Recuperación de fluido oviductal

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada de obtener fluido oviductal con presencia de células epiteliales bovinas para cultivo celular.
- **Materiales:** Tijeras de disección estériles, pinzas estériles, cuchillas de bisturí estériles, láminas portaobjetos estériles, cajas de Petri de 60 y 100 mm estériles, tubos cónicos de 15 ml estériles, gasa estéril y micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l.
- **Medios:** 500 ml de solución salina (NaCl 0,9%) estéril, HEPES, medio de cultivo de células oviductales (ver capítulo 2).



### Procedimiento:

- Retirar la solución salina de transporte del tubo cónico y lavar los oviductos tres veces con solución salina estéril a temperatura ambiente.
- En cabina de flujo laminar, colocar el oviducto sobre una gasa estéril exponiendo el oviducto. Retirar cuidadosamente el mesosalpinx con la ayuda de pinzas y una cuchilla de bisturí, sin cortar el oviducto (ver figuras 3.6 A y B).
- Secar el oviducto disectado con gasa estéril (ver figura 3.6 C).
- Remover 3 cm del extremo del ápice del cuerno uterino y 3 cm del extremo ovárico (fimbrias), dejando solo el ampulla y el istmo (ver figura 3.6 D y E).
- Colocar el oviducto sobre una caja de Petri de 100 mm, la mitad de su longitud en la caja, y la otra mitad en la tapa (ver figura 3.6 F).
- Realizar raspado con una lámina portaobjetos estéril, formando un ángulo de 30° y haciendo presión desde el extremo útero-tubárico hacia el extremo ovárico. Tratar de realizar la mayor parte de manipulación en la caja (no en la tapa) para disminuir el riesgo de contaminación del botón de células que se recuperan (ver figura 3.6 G y H).
- Retirar el oviducto de la caja de Petri. Tomar con una micropipeta de 1000 µl el pellet celular de aspecto denso y color amarillo. Pasar el pellet a una caja de Petri de 35 mm estéril, con 3 ml de medio HEPES, y resuspender el pellet celular. Por último, pasar el pellet a un tubo cónico de 15 ml estéril con 10 ml de medio de lavado HEPES, a temperatura a 37°C (ver figura 3.6 A y B).
- Dejar que las células se sedimenten por gravedad durante 5 min (se pueden obtener entre 0,1 ml a 1 ml de células por cada oviducto procesado).
- Aspirar y descartar el sobrenadante, dejar solo el pellet compuesto por cúmulos grandes de células. Resuspender el pellet con 10 ml de medio HEPES y dejar decantar 5 min.
- Descartar el sobrenadante y adicionar 5 ml de medio HEPES, aspirar suavemente con una jeringa de 5 ml y aguja de 25Gx5/8. Realizar tres pases de las células por la jeringa para separar los cúmulos más grandes.
- Dejar decantar durante 5 min.
- Retirar el sobrenadante y adicionar 10 ml de medio de cultivo de células oviductales a temperatura a 37°C y resuspender.

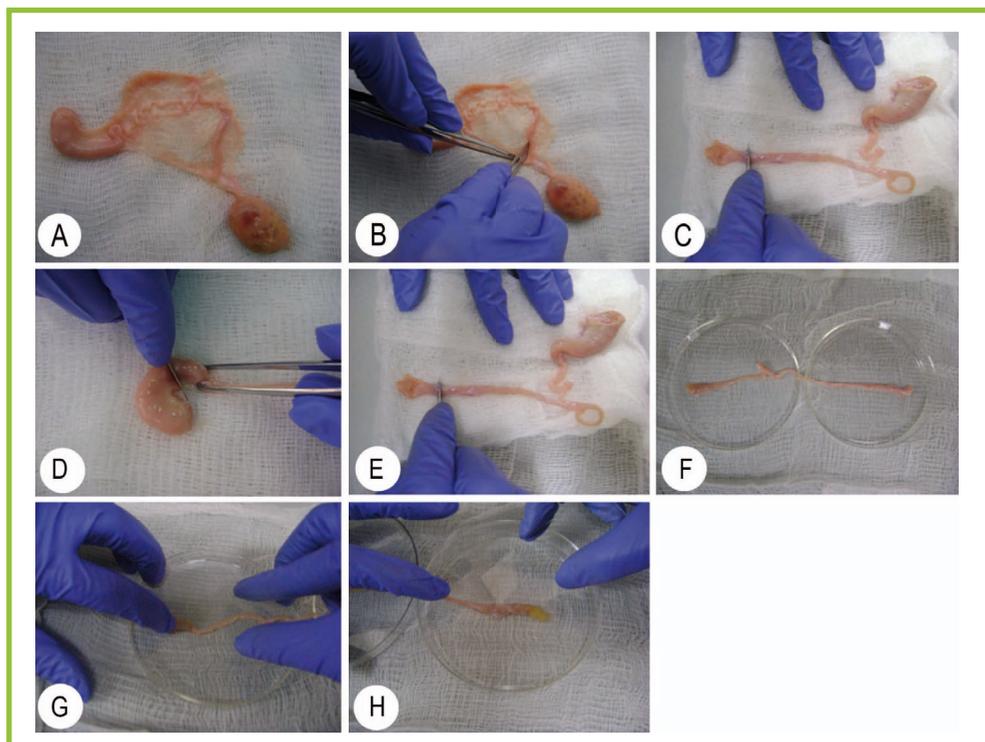


Figura 3.6. A-B-C. Corte de tejido sobrante; D-E. Corte en unión ovárica y útero-tubárica; F-G-H. Raspado de oviducto

## Siembra de células oviductales

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para la siembra y cultivo de células oviductales bovinas.
- **Materiales:** Caja para cultivo celular de 24 pozos, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, incubadora de  $\text{CO}_2$ , microscopio invertido de contraste de fase.
- **Medios:** Medio de lavado HEPES, medio de cultivo de células oviductales (ver capítulo 2).

### Procedimiento:

- Marcar la caja de siembra (24 pozos) con la fecha y el nombre del cultivo. Abrirla solo en la cabina de flujo laminar.
- Colocar en cada pozo 1 ml de medio de cultivo de células oviductales.



- En cada pozo, sembrar 10  $\mu\text{l}$  del último medio resuspendido con las células (ver figura 3.7).
- Incubar bajo ambiente controlado, a 37,5°C, 5% de  $\text{CO}_2$  y humedad relativa del 90%.
- Verificar en microscopio de contraste de fase antes de llevar a la incubadora, la presencia de movimiento ciliar como signo de viabilidad celular (ver figura 3.8, y el enlace [http://www.youtube.com/watch?v=I0zx7iRWxS4&feature=player\\_embedded](http://www.youtube.com/watch?v=I0zx7iRWxS4&feature=player_embedded)).
- Revisar cada 24 horas el estado del cultivo, observar los cambios morfológicos del cultivo, y si hay presencia de pozos contaminados, retirarlos.



Figura 3.7. Cultivo de células de oviducto.

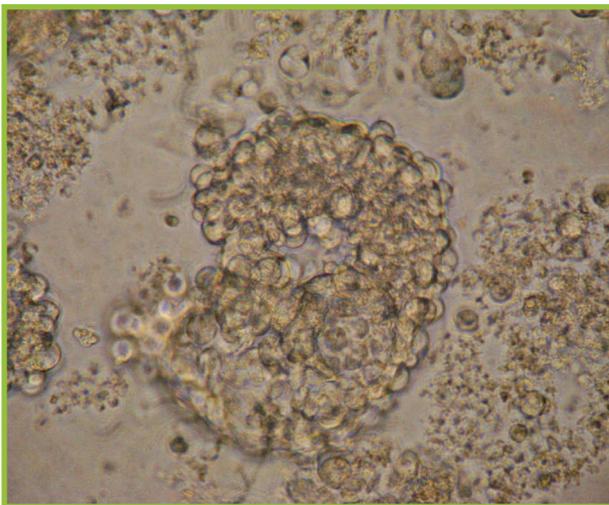


Figura 3.8. Verificación de viabilidad celular en microscopio.

## Evaluación morfológica de cultivo de células oviductales

- **Propósito:** Identificar la morfología característica de las células oviductales bovinas durante su cultivo *in vitro*.
- **Materiales:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjeto.
- **Medios:** Solución de Giemsa (ver capítulo 2).
- **Equipos:** Microscopio invertido de contraste de fases, microscopio óptico.

### Procedimiento:

- Tomar 10  $\mu$ l del último medio resuspendido después de los lavados y realizar un extendido en una lámina portaobjetos.
- Dejar secar al aire.
- Fijar en metanol al 96% por 10 min.
- Aplicar la solución con el colorante Giemsa sobre la lámina portaobjeto, cubriéndola completamente. Dejar actuar por 20 min.
- Lavar suavemente con agua corriente.
- Dejar secar al aire y evaluar al microscopio óptico en objetivo de 40 y 100X.

### Evaluación al día cero y uno:

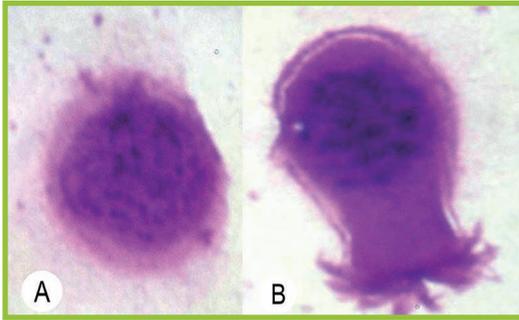
En el epitelio oviductal es importante identificar las células secretoras y las células ciliadas, tanto en su forma simple (ver figura 3.9), como los agregados celulares (ver figura 3.10), los cuales se pueden observar en el medio en suspensión o precipitados en el pozo de cultivo. Según el día de cultivo, ambos tipos celulares forman estructuras diferenciales en el cultivo.

### Evaluación al día tres:

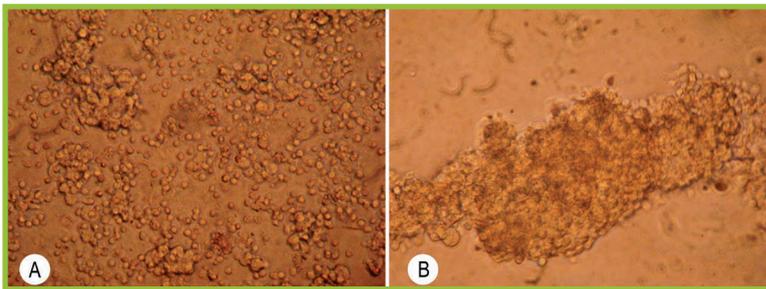
Revisar las células cada 24 horas permite identificar contaminaciones y observar los cambios de morfología. El día tres de cultivo se debe observar, en los agregados celulares en suspensión, un movimiento ciliar activo de las células ciliadas y, en el fondo del pozo, el inicio de la adherencia por parte de las células secretoras que comienzan a formar monocapa (ver figura 3.11)

### Evaluación entre los días cinco y ocho:

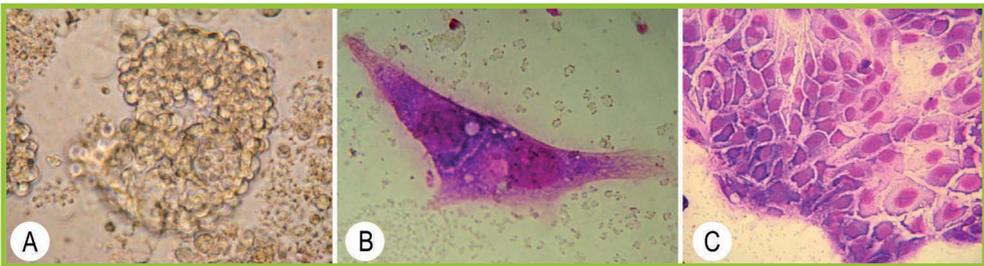
El día cinco de cultivo, las células alcanzan la confluencia tapizando el fondo del pozo, y los agregados de células en suspensión continúan con la presencia de movimiento de forma muy activa. Para el día ocho se puede observar el alargamiento de las células que forman la monocapa, y el movimiento ciliar sigue presente como signo de viabilidad del cultivo (ver figura 3.12, y el enlace <http://www.youtube.com/watch?v=nOtnfAG8STc>).



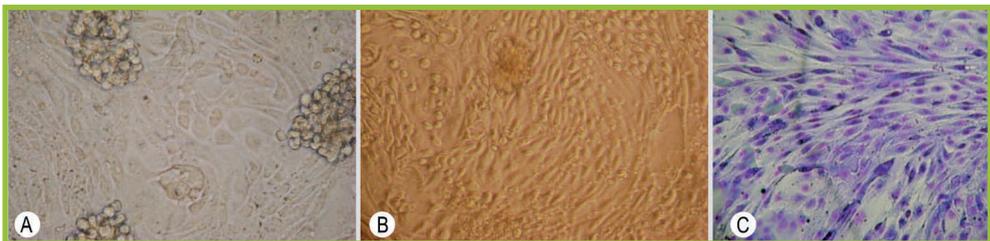
**Figura 3.9.** Morfología celular al día del aislamiento. Tinción de Giemsa. A. Célula secretora del epitelio oviductal; B. Célula ciliada del epitelio oviductal.



**Figura 3.10.** Primer día de cultivo. A: agregados de células precipitados; B: agregado de células en suspensión.



**Figura 3.11.** Día tres de cultivo. A: agregado de células oviductales en suspensión; B: adherencia de células epiteliales oviductales al fondo de la caja; C: inicio de formación de monocapa de células de epitelio oviductal. Tinción de Giemsa.



**Figura 3.12.** Morfología de las células oviductales en cultivo. A: ambos tipos celulares al día cinco; B: ambos tipos celulares al día ocho; C: monocapa al día ocho. Tinción de Giemsa.

## Indicaciones para cocultivo de embriones

- **Propósito:** Identificar la forma adecuada de utilizar cúmulos de células oviductales en el sistema de cocultivo con embriones bovinos.
- **Materiales:** Micropipetas de 10  $\mu$ l.
- **Medios:** Cultivo celular y medio de desarrollo CR1 AA de trabajo (ver capítulo 2).
- **Equipos:** Estereoscopio.

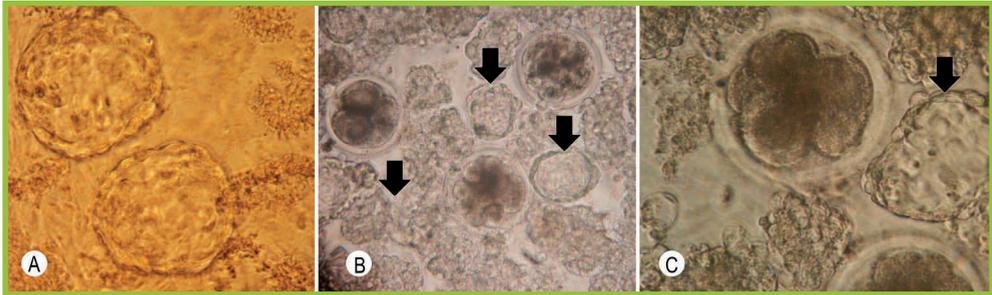
### Procedimiento:

- El cultivo de células de oviducto se inicia el mismo día de la maduración de los oocitos; así, el tercer día coincide con el momento en el cual los presuntos cigotos inician la etapa de cultivo.
- Veinte minutos antes del momento de cultivo de los presuntos cigotos, se sacan las cajas de cultivo celular y se evalúan aquellos pozos que tengan células con movimiento ciliar activo y que no presenten contaminación.
- Seleccionar colonias celulares con movimiento celular activo y someterlas a tres lavados en gotas de 50  $\mu$ l de medio de cultivo celular y una gota final de 100  $\mu$ l de medio CR1 AA, antes de colocarlos con los embriones.
- Sacar la caja de cultivo de embriones previamente preparada, y colocar diez agregados por cada embrión que se vaya a poner en cultivo.
- Realizar los procedimientos de cultivo de embriones in vitro (ver capítulo 5) y colocarlos en la caja previamente preparada con los agregados celulares de oviducto. Llevar a la incubadora bajo las condiciones utilizadas para embriones (ver figura 3.13).

## Procedimientos para aislamiento y cultivo primario de células endometriales epiteliales bovinas (CEEP)

### Toma de muestras: recolección de úteros

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para la selección, recolección y transporte de úteros desde la planta de beneficio hasta el laboratorio.
- **Materiales:** Nevera de poliestireno expandido (icopor), pilas de frío, tijeras estériles, guantes estériles, bolsas resellables, overol, botas, casco y gorro blanco.
- **Indumentaria:** planta de beneficio local para toma de muestras (ver capítulo 1)
- **Medios:** 1000 ml de solución salina (NaCl 0,9%) (ver capítulo 2).



**Figura 3.13.** Cocultivo de células oviductales y embriones.

A. agregados de células oviductales seleccionados; B y C. embriones en cocultivo. Las flechas muestran los agregados de células oviductales. Microscopio invertido.

#### Procedimiento:

- Poner las pilas de frío en la nevera de poliestireno expandido para garantizar una temperatura aproximada de 4°C. Adicionar solución salina en la bolsa resellable e introducirla en la nevera, procurando en todo momento mantenerla cerrada para evitar un aumento de temperatura.
- No incluir úteros grávidos dentro del material recolectado, ya que es frecuente la presencia de preñeces, no detectables al tacto, en el momento de seleccionarlos (ver figura 3.14 A). Tener en cuenta la actividad de los ovarios, seleccionar los que tengan cuerpo lúteo y folículos, y no retirar los ovarios hasta llegar al laboratorio (ver figura 3.14 B).
- Retirar con cuidado el tejido circundante (mesometrio, ligamento ancho, etc.), para no ocupar mucho espacio en la bolsa, y depositar los úteros dentro de esta con solución salina. Cerrar la bolsa.
- Depositar la bolsa en la nevera y tapar. Repetir este proceso para cada útero.
- Finalizada la recolección, retirar con cuidado la solución salina sucia y lavar dos veces los úteros con solución salina limpia para extraer la mayor cantidad de sangre posible.
- Adicionar la cantidad suficiente de solución salina limpia para cubrir los úteros, sellar las bolsas y asegurarse de que quede la menor cantidad de aire posible.
- Verificar la hora de salida, cerrar muy bien la nevera y transportarla lo más pronto posible al laboratorio.

*Nota:* El tiempo máximo desde el inicio de la recolección de úteros hasta llegar al laboratorio no debe superar las dos horas.



Figura 3.14 A. Útero con preñez temprano (no apto para recolección); B. Útero apto para cultivo de CEEP.

### Preparación de úteros para aislamiento de CEEP

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para el procesamiento de los úteros en el laboratorio antes de realizar el aislamiento de CEEP.
- **Materiales:** Cedazo metálico, tijeras estériles, guantes estériles, gasas estériles.
- **Medios:** 1000 ml de solución salina (NaCl 0,9%), 700 ml de solución salina yodada (ver capítulo 2), alcohol al 70% y clorexidina.

Procedimiento:

- Al momento de llegar al laboratorio, verificar la hora.
- Depositar los úteros en el cedazo metálico.
- Lavar los úteros con 500 ml de solución salina. Retirar la mayor cantidad de sangre posible y desinfectar su parte externa con 500 ml de solución salina yodada (2%) (ver figura 3.15).

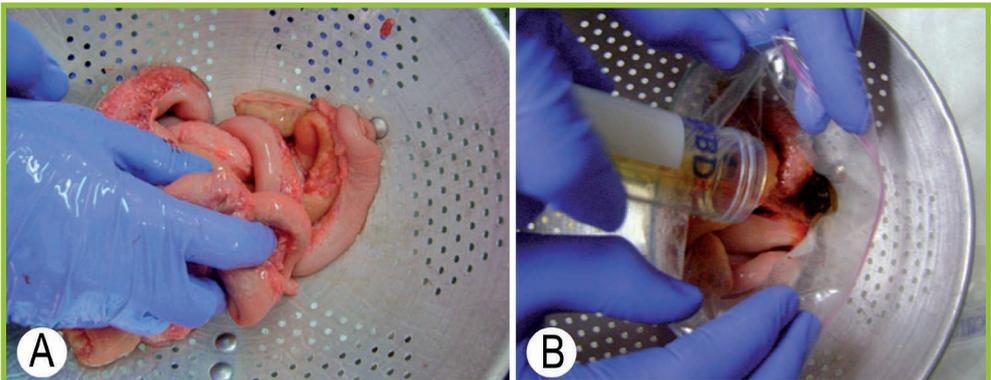
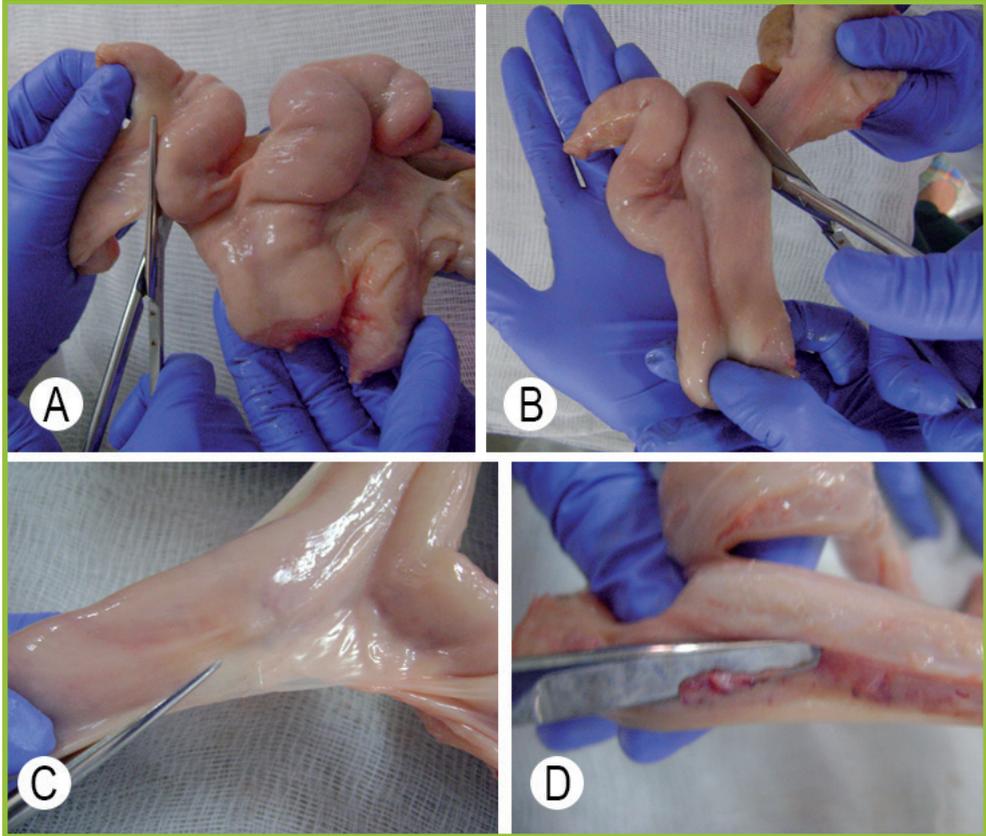


Figura 3.15. Lavado de úteros bovinos provenientes de matadero. A: Con solución salina; B: Con solución yodada.



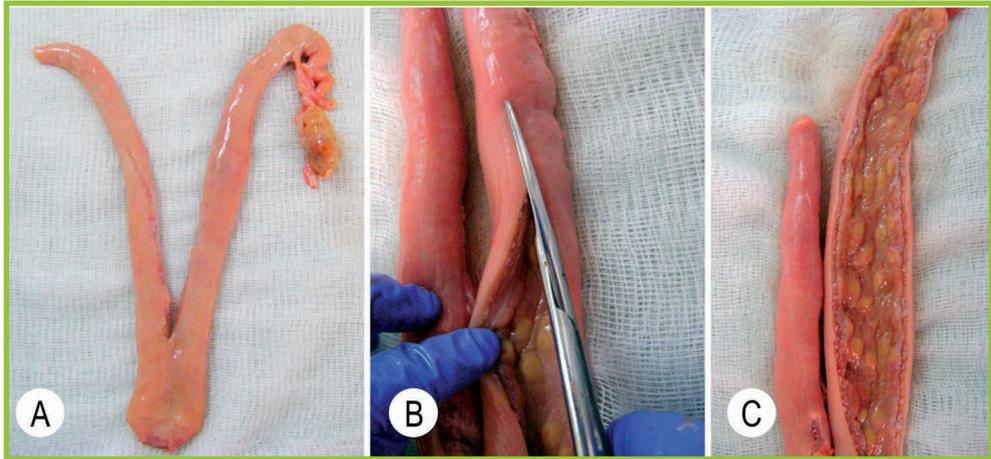
- Retirar con cuidado el tejido conectivo (mesoovario, mesosalpinx y mesometrio) circundante con tijeras estériles y la mayor parte de tejido vascular sin exponer el endometrio (ver figura 3.16).
- Descartar aquellos úteros que presenten material purulento, material sanguinolento, petequias, u otros signos de inflamación o lesión.



**Figura 3.16.** Preparación del útero. A-B. Tejido conectivo; C. Ligamento intercornual; D. Tejido vascular.

- f) Lavar externamente con alcohol al 70% el material resultante.
- g) Realizar otro lavado externo con solución salina yodada (2%).
- h) Extender una gasa estéril sobre una superficie plana, previamente desinfectada, y ubicar los úteros allí.
- i) Con unas tijeras estériles, realizar un corte desde el cuerpo del útero hasta la parte apical del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo (ver figura 3.17).

- j) Exponer el endometrio en forma cuidadosa, lavar dos veces con 25 ml de clorhexidina, frotar suavemente el tejido y retirar la mayor cantidad de moco.
- k) Lavar rápidamente con solución salina para evitar residuos de clorhexidina.
- l) Descartar los úteros que presenten alteraciones en el endometrio, que puedan alterar la viabilidad de las células epiteliales.



**Figura 3.17.** Preparación del útero. A: la flecha indica el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo; B: inicio del corte desde el cuerpo del útero; C: finalización del corte en la parte apical del cuerno uterino. La flecha indica el aspecto morfológico ideal del endometrio para el aislamiento de las CEEP.

## Aislamiento mecánico de CEEP

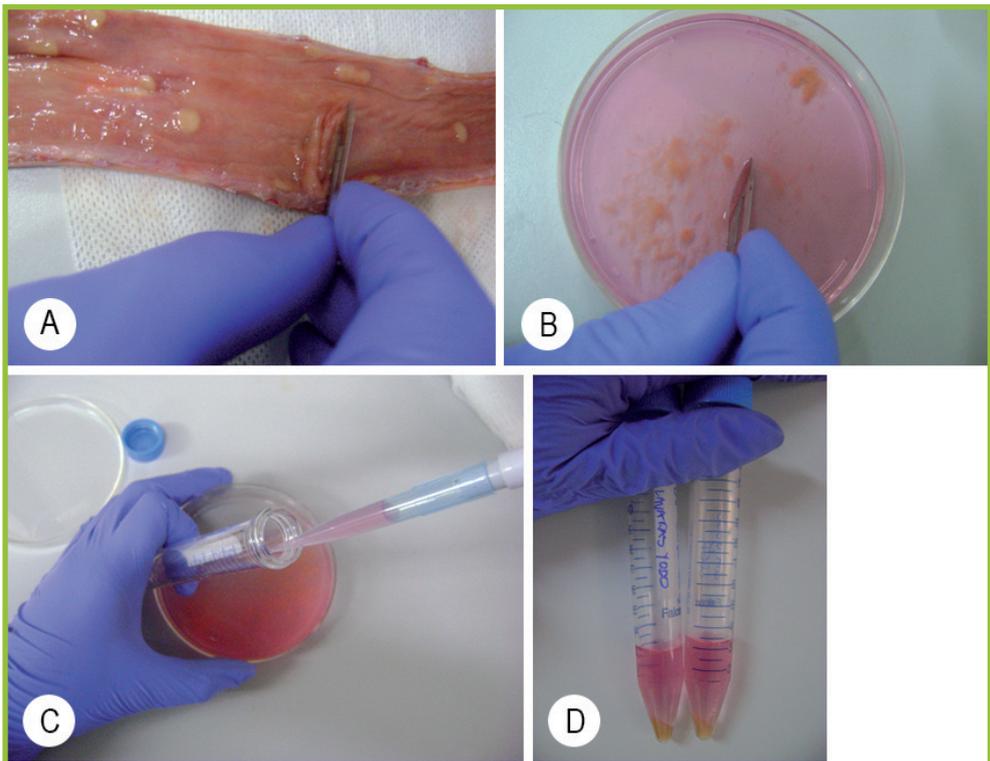
- **Propósito:** Indicar el procedimiento adecuado para el aislamiento mecánico de CEEP.
- **Materiales:** Úteros con endometrio expuesto previamente lavados y desinfectados, gasa estéril, cuchillas de bisturí estériles, cajas Petri de 60 mm, tubos cónicos de 15 ml estériles, gradilla y marcador.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ l, puntas para micropipeta de 100 y 1000  $\mu$ l estériles, centrífuga.
- **Medios:** Hank's Balance Salt Solution (HBSS) y RPMI suplementados (ver capítulo 2).

### Procedimiento:

- Desinfectar todas las superficies de la cabina de flujo laminar y tener listos todos los materiales requeridos, para agilizar el proceso.
- Adicionar, en una caja Petri de 60 mm, 3 ml de HBSS suplementado.



- Poner los úteros sobre una capa de gasa con el endometrio hacia arriba, procurando que este no esté en contacto con ninguna superficie (ver figura 3.18 A).
- Con la cuchilla de bisturí, hacer un raspado de la superficie del tejido de forma suave y longitudinal. Comenzar desde el extremo apical del cuerno hacia el cuerpo del útero, de forma unidireccional y sin repetir en el mismo punto el raspado, para evitar la presencia de células estromales o sanguíneas (ver figura 3.18 A). Recorrer de esta manera todo el endometrio. Una vez finalice el raspado zonal, introducir la cuchilla en la caja Petri, previamente preparada, y realizar un movimiento firme para desprender las células de la cuchilla (ver figura 3.18 B).
- Depositar el contenido de la caja Petri en un tubo cónico de 15 ml (ver figura 3.18 C).
- Centrifugar tres veces a 2500 RPM por cinco minutos (ver figura 3.18 D). Tener en cuenta que se debe cambiar el HBSS (las primeras dos veces) y resuspender el botón cada vez que se centrifugue. Luego de la última centrifugación, cambiar el HBSS por RPMI.



**Figura 3.18.** Aislamiento de CEEP. A. Raspado del endometrio; B. Disposición de material recuperado del endometrio en el medio de lavado; C. Recolección del material para centrifugación; D. Material resultante después de centrifugar.

## Cultivo de CEEP

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada de realizar el cultivo primario de CEEP.
- **Materiales:** Cajas de 24 pozos, puntas para micropipeta de 100 y 1000  $\mu$ l estériles.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ l, incubadora, microscopio invertido, cámara de Neubauer.
- **Medios:** Medio para cultivo de CEEP (ver capítulo 2).

Recuento de CEEP: después de la centrifugación, homogenizar nuevamente el contenido para obtener 5  $\mu$ l del tubo cónico de 15 ml, para ser diluido en 95  $\mu$ l de agua dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, para un volumen final de 100  $\mu$ l (dilución 1:20). Guardar el resto del contenido en la incubadora. Poner 10  $\mu$ l de la dilución en cada celda de la cámara de Neubauer, previamente preparada, y realizar conteo (ver capítulo 5).

Marcar la caja (24 pozos) con la fecha, el nombre del biotipo celular (CEEP) y el responsable, asegurándose de abrirla solamente en la cabina de flujo laminar (ver figura 3.19).

- Calcular la siembra para una concentración final de 600.000 células /ml.
- Incubar a 37,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 90%.
- Realizar el cambio de medio de cultivo cada 48 horas, inclinando la caja de cultivo en un ángulo aproximado de 45°. Retirar solo 800  $\mu$ l de cada pozo y reponer el mismo volumen de medio RPMI suplementado.

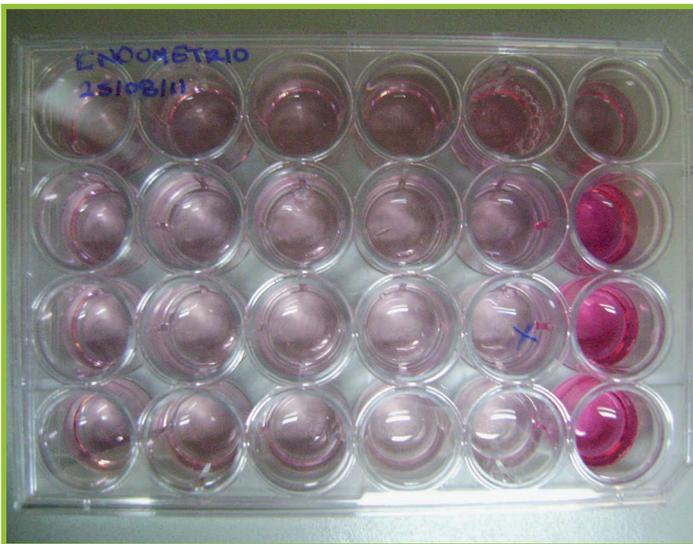
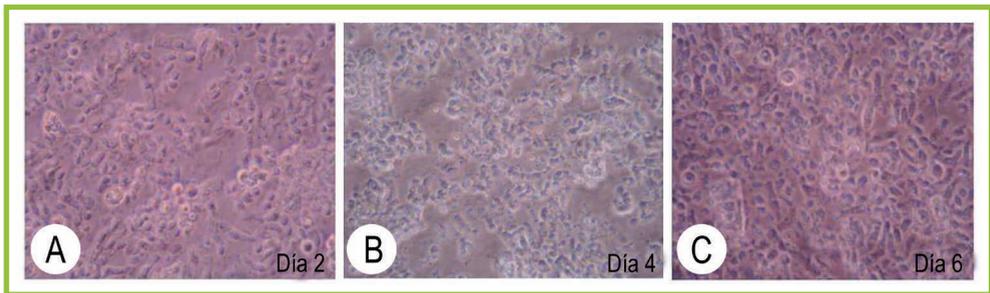


Figura 3.19. Caja de cultivo lista para ser introducida en la incubadora.



## Características de las CEEP a los dos, cuatro y seis días de cultivo

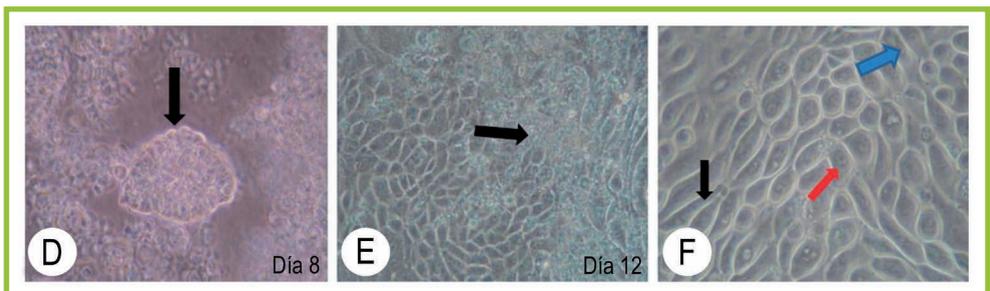
- Las células, una vez sembradas, no experimentan ningún cambio morfológico aparente hasta el día dos o tres.
- Al día cinco o seis, las células inician la formación de pseudópodos irregulares y se adhieren al piso del plato.
- La aproximación celular inicia más o menos a las 12 horas de cultivo, y logra una confluencia aproximadamente del 90% al día 14 (ver figura 3.20).



**Figura 3.20.** Cinética y dinámica de cultivo de las CEEP en cultivo primario. Las CEEP no presentan cambios aparentes hasta el día cuatro a cinco, cuando inician el proceso de adhesión por zonas. Obsérvese que en los días dos, cuatro y seis, más del 90% de las células presentan morfología irregular.

## Características de las CEEP a los ocho, doce y catorce días de cultivo

Las CEEP presentan una morfología cuboidal, columnar o piramidal (ver figura 3.21).



**Figura 3.21.** Cinética y dinámica de las CEEP en cultivo primario a los días 8, 12 y 14. A. Las células inician la formación de islotes o botones celulares organizados al día 8 de cultivo; B. El día 12 aumentan la confluencia; C. El día 14 alcanzan una confluencia de aproximadamente el 90%. En la figura se observan las células flotantes. Las flechas de colores muestran: azul, células con morfología columnar; negra, morfología piramidal; roja, morfología cuboidal.

La senescencia celular, o muerte celular, hasta el día 10 de cultivo, puede ser evaluada indirectamente por el porcentaje de células flotantes en el pozo. Las células con senescencia, o muertas, se dispondrán en la superficie del pozo (células flotantes).

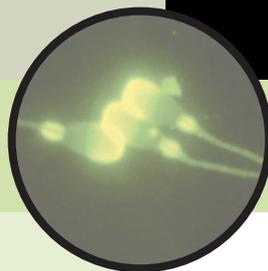
Si el porcentaje de células flotantes supera el 80%, de la superficie del pozo, se sugiere repetir el proceso.



## Bibliografía recomendada

- Angulo J. et al (2005). Efecto de la suplementación con grasa sobrepasante, sobre algunos parámetros reproductivos de vacas de carne. *Rev Col Cienc Pec* 18(4): 353.
- Arosh J, Banu S, Chapdelaine P, Emond V, Kim J, MacLaren L, Fortier M (2003), Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy, *Endocrinology* 7, 3076-3091.
- Arosh J, Banu S, Kimmins S, Chapdelaine P, Maclaren L, Fortier M (2004), Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2, *Endocrinology* 11, 5280-2593.
- Asselin E, Bazer F, Fortier M (1997), Recombinant ovine and bovine interferons tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells, *Biol Reprod* 2, 402-408 (b).
- Asselin E, Goff A, Bergeron H, Fortier M (1996), Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium, *Biol Reprod* 2, 371-379.
- Asselin E, Lacroix D, Fortier M (1997), IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro, *Mol Cell Endocrinol*, 1-2,117-126 (a).
- Bedoya J, Penagos F, Lenis Y, Olivera M, Tarazona A (2009), Cinética de la luteólisis funcional en un modelo de cuerpo lúteo in vitro, *Revista Colombiana de Ciencias Pecunarias*, 22:3 568-569.
- Castillo J et al (1997) Reactivación ovárica en vacas cebú Brahman con relación al peso y la condición corporal. *Rev Col Cienc Pec* 10(1): 12-18.
- Fortier M, Guilbault L, Grasso F (1988), Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows, *J Reprod Fertil* 1, 239-248.
- Giraldo CA et al (2005). Interrupción temporal del amamantamiento (ITA) en vacas Cebú y su efecto en la función ovárica. *Redvet* 6(2): 12050-12070.
- Giraldo CA et al (2008). Efecto de la variación del peso y la condición corporal, y la expresión de receptores de leptina y hormona luteinizante, sobre la anovulación posparto en vacas cebú (*Bos indicus*). *Rev Col Cienc Pec* 21(2): 228-238.
- Godkin J, Roberts M, Elgayyar M, Guan W, Tithof P (2008), Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production, *Reprod Biol Endocrinol* 23, 6:44.
- Henoa D et al (2004). Comportamiento durante el calor y dinámica folicular interestral en vacas BON (Blanco Orejinegro). *Rev Col Cienc Pec* 17(1): 39-44.
- Henoa G et al (2000). Follicular dynamics during postpartum anestrous and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (*Bos indicus*) cows. *Anim Reprod Sci* 63(2):127-136.
- Lenis Y et al (2009a). Cinética de la producción de progesterona en células de la granulosa luteinizadas *in vitro*. *Rev Col Cienc Pec* 22(3): 569.
- Lenis Y et al (2009b) Aislamiento y caracterización de células epiteliales endometriales bovinas en cultivo primario. *Rev Col Cienc Pec* 22(3): 566.
- Lenis Y et al (2010a). Señales moleculares que afectan la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{PGE}_2$  en el endometrio bovino. *Rev Col Cienc Pec* 23: 377-389.
- Lenis Y et al (2010b). Interferón Tau en la ventana de reconocimiento materno embrionario bovino. *Rev UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 13(1): 17-28.
- Lenis Y et al (2013). Efecto del ácido linoléico sobre la producción de las prostaglandinas  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{PGE}_2$  en células endometriales. *Rev MVZ* 18(2): 3559-3568.
- Lenis Y, Bedoya J, Ruiz-Cortez Z (2010), Simple Protocol to Cryopreserve Bovine Endometrial Epithelial Cells, *Biology of Reproduction*, 83: 664.

- Lenis Y, Olivera M, Tarazona A (2009). Caracterización de la dinámica del cultivo primario in vitro de células epiteliales endometriales bovinas, a diferentes concentraciones de siembra, *Rev Col Cienc Pec* 22 (3): 566-580.
- López A et al (2007). Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos in vitro. *Rev MVZ Córdoba* 12(2): 1061-1067.
- López A et al (2008). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. *Analecta Veterinaria* 28(1): 42-47.
- Mahecha L et al (2004). Influence of temporal interruption of suckling on weight at weaning in Zebu calves in silvopastoral systems with supplementation. *LRRD* 16(5): 1-5.
- Mesa C et al (2008a). Bypass fat supplementation in Zebu cows (*Bos indicus*) in the early postpartum: an alternative decrease the open days period? *Reprod Domestic Anim* 43(3): 29-29.
- Mesa C et al (2008b). Effect of linoleic acid on the production of PGF<sub>2α</sub> in bovine endometrial cells in vitro: indirect evaluation. *Reprod Domestic Anim* 43(3): 54-54.
- Montaño E, Olivera M, Ruiz-Cortes ZT (2009). Association between leptin, LH and its receptor and luteinization and progesterone accumulation (P4) in bovine granulosa cell in vitro, *Reprod Domest Anim* 44(4): 699-704.
- Murakami S, Shibaya M, Takeuchi K, Skarzynski D, Okuda K (2003). A passage and storage system for isolated bovine endometrial epithelial and stromal cells, *J Reprod Dev* 6, 531-538.
- Murphy BD (2000) Models of luteinization. *Biology of reproduction* 63: 2-11.
- Olivera M et al (2007). Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Rev Col Cienc Pec* 20(1): 387-393.
- Rodríguez JC et al (2007). Análisis multifactorial de las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia. *Rev MVZ* 12(2): 978-984.
- Ruiz-Cortés ZT et al (1999). Interacción reproducción-nutrición en los animales domésticos: ¿es la leptina la clave? *Rev Col Cienc Pec* 12(2): 145-151.
- Ruiz-Cortés ZT y Olivera M (1999). Ovarian follicular dynamics in Zebu (*Bos indicus*) suckled cows monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 54(4): 211-220.
- Serrano CA y Olivera M (1997). Caracterización de la función luteal durante el primer ciclo posparto inducido por medio de un progestágeno en vacas cebú Brahman en amamantamiento. 1997. *Rev Col Cienc Pec* 10(1): 29-37.



# Capítulo 4

## **Procedimientos para la evaluación de semen utilizado en la producción de embriones bovinos**

**Autores: Ariel Marcel Tarazona Morales, David Andrey Cadavid Betancur, Martha Olivera Angel y Ángela Patricia López Cardona**

En un laboratorio de producción de embriones in vitro, así como en centros de reproducción animal, la calidad del semen empleado en las diferentes técnicas de fertilización es fundamental para obtener resultados exitosos. Antes de emprender cualquier procedimiento, es necesario determinar cuáles son los mejores reproductores y cuáles son los que ofrecen mejores resultados en los procesos realizados en cada laboratorio.

La fisiología del espermatozoide ha sido una línea importante en el desarrollo científico del Grupo de Investigación Biogénesis.

Una de nuestras motivaciones principales ha estado orientada a la conservación de especies autóctonas o en peligro de extinción, con el fin de aportar información básica y aplicada sobre la conservación de bancos de germoplasma y sobre el desarrollo de técnicas de inseminación artificial, por ejemplo: caracterizaciones seminales en peces como la sabaleta (*Brycon henni*), en mamíferos como la guagua o el tapir (*Agouti paca*) o en ganado criollo bovino blanco orejinegro. También en especies con interés productivo, como el ganado bovino cebú y en razas lecheras especializadas, en peces como la trucha y la tilapia y en caninos y porcinos, para perfeccionar las técnicas de análisis seminal, evaluar con mayor exactitud la fertilidad de sementales y hacer aportes en cuanto a las técnicas de congelación, inseminación artificial y fertilización *in vitro* de embriones. Algunos de los artículos producidos se encuentran en la bibliografía recomendada al final de este capítulo.

## Evaluación macroscópica de semen fresco

- **Propósito:** Describir el procedimiento adecuado para evaluar características macroscópicas en muestras de semen fresco.
- **Materiales:** Tubos cónicos de 15 y 50 ml, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos, puntas para micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Microscopio, micropipetas y potenciómetro.
- **Procedimiento:** Una vez recibida la muestra se procede inmediatamente a la evaluación de los parámetros macroscópicos, así:

**Volumen:** leer directamente en un tubo de centrifuga graduado, o con una pipeta volumétrica. El volumen de semen varía desde uno hasta ocho centímetros cúbicos. La mayoría de los toros en condiciones normales proporcionan de 2 a 6 ml. Para semen obtenido con electroeyaculador, el volumen puede ser de 10 a 20 ml.

**Color:** depende de la cantidad de espermatozoides; cuando el semen es de buena calidad, presenta una coloración blanca, marfil o amarilla, y cuando es de baja calidad, su color es opalescente o transparente.

**Apariencia:** se toman como referencia subjetiva los siguientes patrones relacionados con la consistencia: cremosa, lechosa, serosa o acuosa (ver figura 4.1).

**pH:** se determina mediante el uso del potenciómetro, o con tirilla de papel para pH. Su valor varía entre 6,4 a 6,9; valores por encima de 6,9 son indicativos de semen de baja calidad.



Figura 4.1. Evaluación macroscópica del semen.

**Movilidad masal:** colocar una gota de 10  $\mu$ l de semen en una lámina portaobjetos previamente temperada a 37°C. Observar al microscopio con un aumento de 10X. En toda la gota se debe observar presencia de ondas y remolinos, que se clasifican así:

**Semen muy bueno (+++):** presenta ondas oscuras marcadas, con movimiento rápido (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=0cPkop9N4-U>).

**Semen bueno (++):** se observan ondas menos oscuras que el anterior, marcadas con movimiento moderado (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=y6SWYrkjSb8>).

**Semen regular (+):** presenta ondas claras con movimiento muy ligero (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=uc-avQiZlJc>).

**Semen malo (0):** no hay ondas (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=Qacz6BTpVXc>).

## Cuadro espermático estándar

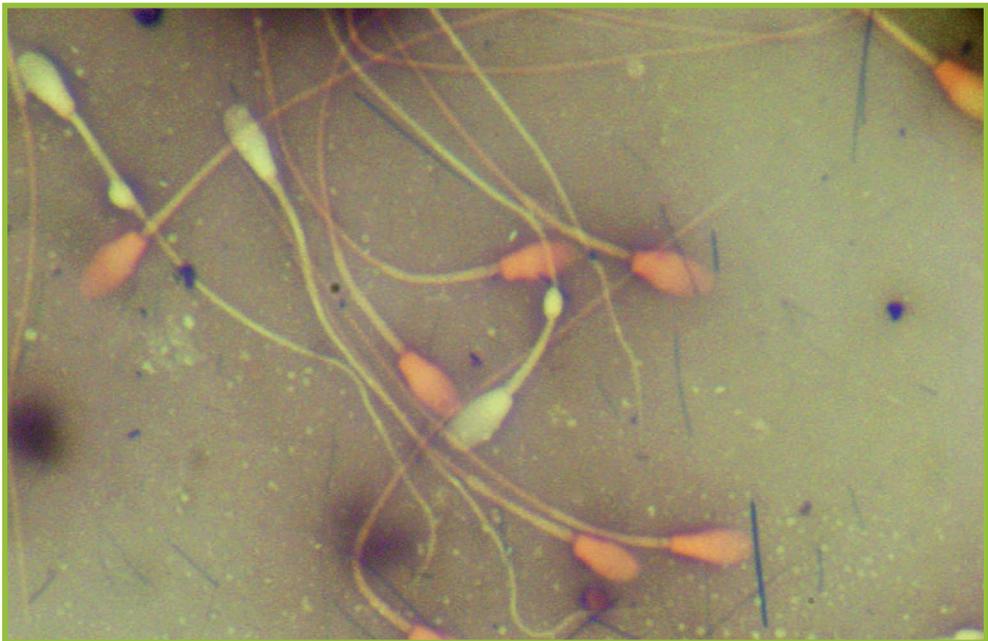
- **Propósito:** Indicar el procedimiento para la evaluación del cuadro espermático estándar, que incluye movilidad, morfología, viabilidad y concentración espermáticas.
- **Materiales:** Tubos cónicos de 15 y 50 ml, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Microscopio, micropipetas, vórtex, cámara de Neubauer.
- **Reactivos:** Colorante de Giemsa (solución de trabajo), eosina-nigrosina (solución de trabajo) (ver capítulo 2), aceite de inmersión, metanol (96%), solución salina (NaCl 0,9%).

### Procedimiento:

- *Morfología de los espermatozoides:* Este parámetro permite determinar si la muestra tiene un número normal de espermatozoides con morfología normal. De acuerdo al tipo de anomalías detectadas se puede determinar si los daños son compensables o no compensables.
- Realizar un extendido del semen sobre una lámina portaobjetos limpia, poner 10  $\mu$ l de la muestra en el extremo de esta y colocar otra lámina portaobjetos sobre la gota de muestra; esperar que se extienda por capilaridad e inclinarla en un ángulo de aproximadamente 45°, deslizar suavemente esta lámina sobre la primera y dejar secar el extendido.
- Fijar la muestra extendida sumergiéndola durante diez minutos en metanol (96%) previamente refrigerado a 4°C. Sacar la lámina del metanol y dejarla secar.
- En un tubo de 15 ml o 50 ml, según las láminas a colorear, realizar una dilución del colorante así: por cada lámina, poner 3 ml de agua destilada y 15 gotas del colorante Giemsa, adicionar esta mezcla sobre la lámina y esperar 30 minutos.
- Lavar suavemente con agua del grifo y dejar secar.
- Observar al microscopio con objetivo de 100X, colocando aceite de inmersión.
- Realizar la evaluación morfológica de los espermatozoides, contar 200 espermatozoides y anotar cuántos son normales y cuántos anormales, definiendo el tipo de anomalía. Expresar el resultado en porcentaje (ver figura 4.2).
- *Viabilidad:* Esta prueba permite determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en la muestra.
- Colocar en el extremo de una lámina portaobjetos 10  $\mu$ l de semen y 10  $\mu$ l de colorante (eosina-nigrosina) y mezclar bien las dos gotas. Tanto la placa como el colorante deben estar temperados a 37°C.
- Colocar otra lámina nueva sobre la gota, esperar a que se extienda por capilaridad e inclinarla en un ángulo de aproximadamente 45°, deslizar suavemente esta lámina sobre la primera y dejar secar.
- Observar al microscopio con objetivo de 100X, contar 200 espermatozoides y clasificarlos según las siguientes características: citoplasma rosado, espermatozoides muertos; citoplasma transparente, espermatozoides vivos.
- La viabilidad se registra en porcentaje de espermatozoides vivos (ver figura 4.3)
- *Movilidad individual:* Evalúa la capacidad de los espermatozoides para moverse en forma rectilínea progresiva.



**Figura 4.2.** Evaluación de morfología espermática. Coloración de Giemsa.



**Figura 4.3.** Evaluación de viabilidad espermática. Espermatozoides muertos con coloración rosada en la cabeza. Coloración de eosina-nigrosina.

- Hacer una dilución 1:20 del semen fresco, colocando 5 µl de semen y 95 µl de solución salina (0,9%), a 37°C, en un tubo de microcentrífuga. Homogenizar con vórtex. Para el caso de semen congelado, no hacer esta dilución.
- Precalear una lámina cubreobjetos a 37°C, adicionar una gota del semen diluido, colocar la laminilla cubreobjetos, y observar al microscopio en 40X.
- Evaluar a los cero, cinco y diez minutos, determinando, subjetivamente, el porcentaje de espermatozoides con movilidad rectilínea, vigorosa, constante y progresiva hacia delante.
- Para la evaluación a cinco y diez minutos, homogenizar la muestra y montar nuevamente el semen en placas precalentadas. Entre cada montaje, la muestra debe guardarse en la incubadora a 37°C. Reportar la evaluación de la siguiente manera:  
**Semen muy bueno:** igual o mayor de 70% de movilidad individual (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=9w3WNDpeucA>).  
**Semen bueno:** 50-69% de movilidad individual.  
**Semen regular:** 30-49% de movilidad individual.  
**Semen malo:** menos de 29% de movilidad individual (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=8yXOncouHnQ>).
- *Recuento de espermatozoides:* Permite determinar si la concentración de espermatozoides por mililitro de eyaculado se encuentra dentro de los parámetros normales de acuerdo a las características de cada individuo.
- Realizar una dilución 1:20 del semen, en agua destilada, colocando 95 µl de agua destilada en un tubo de microcentrífuga, y adicionar 5 µl de semen. Homogenizar con un vórtex.
- Colocar, cuidadosamente, con una micropipeta, 10 µl de la dilución en cada uno de los lados de la cámara de Neubauer. Dejar un minuto en reposo.
- Contar los espermatozoides de la siguiente forma: del cuadro central de cada cámara, seleccionar cinco cuadrantes; en cada uno de ellos, contar las cabezas de los espermatozoides que se encuentran adentro y las que están tocando los bordes (línea triple) inferior e izquierdo (ver figura 4.4).
- Calcular con la fórmula de la figura 4.5 la concentración de espermatozoides. El resultado se registra como millones de espermatozoides por mililitro.

## Test hiposmótico (HOST)

- **Propósito:** Describir el procedimiento adecuado para realizar el test hiposmótico, que determina la capacidad de la membrana plasmática espermática para realizar endosmosis positiva.

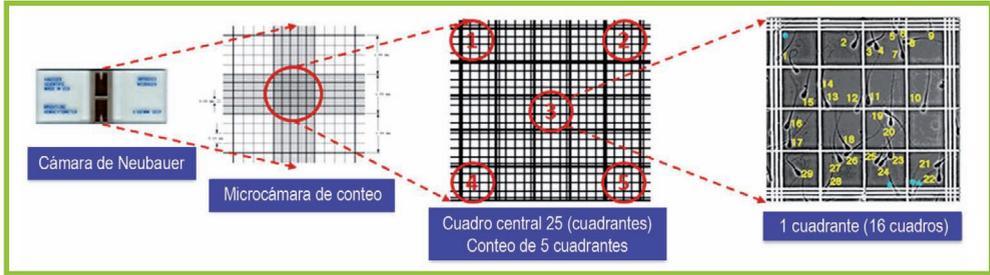


Figura 4.4. Metodología de conteo de células espermáticas en cámara de Neubauer.

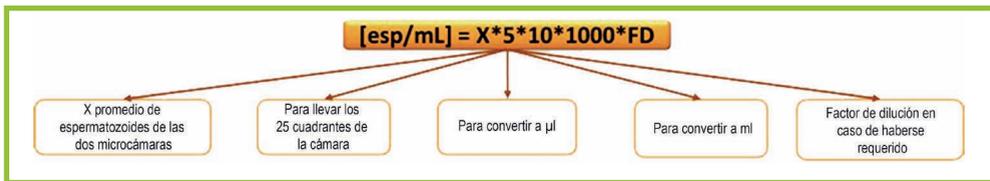


Figura 4.5. Explicación de la fórmula para el cálculo de concentración espermática en una muestra de semen.

- **Materiales:** Tubos cónicos de 15 y 50 ml, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos, puntas para micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Microscopio, micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1000 µl, vórtex.
- **Medios:** Solución hiposmótica para test de Host (ver capítulo 2), solución salina o solución isosmótica (NaCl 0,9%).

#### Procedimiento:

- Diluir 50 µl de semen en 1 ml de solución hiposmótica. Preparar un control, diluyendo 50 µl de semen en 1 ml de solución salina. Incubar ambos a 37°C durante 30 minutos.
- Realizar un extendido de la muestra y del control, sobre láminas portaobjetos. Dejarlas secar al aire.
- Fijar las placas con metanol al 96%, a 4°C, durante 10 minutos, y luego dejarlas secar al aire (ver figura 4.6).
- Observar bajo microscopio de contraste de fase y realizar conteo de 200 células, teniendo en cuenta que los espermatozoides con endosmosis positiva presentarán la cola hinchada y enroscada. Los espermatozoides con endosmosis negativa presentan un aspecto normal (ver figura 4.7). Los resultados se calculan con la siguiente fórmula:

EP = EPM-EPC

EP: Endosmosis positiva, EPM: Endosmosis positiva de la muestra, EPC: Endosmosis positiva del control



Figura 4.6 Diagrama de la prueba del test hiposmótico.

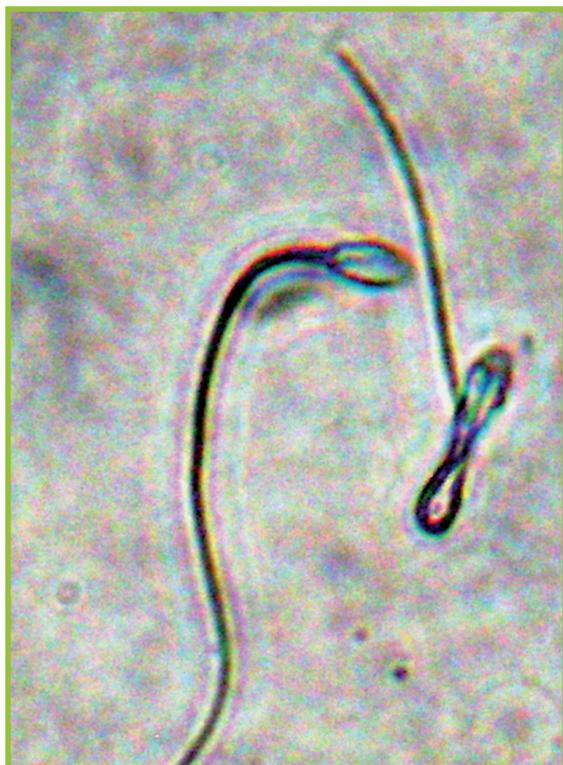


Figura 4.7. Espermatozoides con endosmosis positiva presentarán la cola hinchada y/o enroscada y espermatozoides con endosmosis negativa presentan un aspecto normal y su cola se observa en forma de látigo.

Los criterios de evaluación (desde muy malo hasta muy bueno) se estiman según el porcentaje de colas hinchadas vistas en la evaluación (ver tabla 4.1.)



**Tabla 4.1.** Resultados expresados en porcentaje de colas hinchadas y criterios de evaluación.

Muy bueno	> 71%
Bueno	64-71%
Regular	54-63%
Malo	46-53%
Muy malo	< 45%

## Prueba de reacción acrosomal

- **Propósito:** Describir el procedimiento adecuado para evaluar la reacción acrosomal de semen bovino.
- **Materiales:** Puntas para micropipetas, tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, toallas absorbentes de papel, láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos, agua destilada.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios y reactivos:** Medio de Inducción (MI), Percoll 90 y 45%, PISUM-FITC de trabajo, (ver capítulo 2), alcohol antiséptico, PHE, heparina, Suero Fetal Bovino (SFB), metanol (96%), aceite de inmersión.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, incubadora de CO<sub>2</sub>, microcentrífuga, resistencia eléctrica, microscopio de epifluorescencia, gradilla para tubos de microcentrífuga, micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1000 µl, tijeras rectas, cámara húmeda.

### Procedimiento:

- De cada una de las pajillas, y como control preinducción (0 horas), hacer un extendido (10 µl) de semen recién descongelado o fresco. Marcar muy bien la lámina con un lápiz de cera o un lápiz de punta de diamante.
- Realizar el proceso de separación de la fracción móvil con el gradiente de Percoll. Tener en cuenta que se requiere como mínimo una muestra de 200 µl de semen (ver capítulo 5).
- Para la inducción de la reacción acrosomal, colocar 100 µl del semen recuperado post-Percoll en el medio de inducción (MI). Homogenizar por pipeteo.
- Cerrar bien los tubos de microcentrífuga e incubar a 38°C durante 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación, centrifugar los tubos a 210 G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante con una pipeta sin perturbar el pellet formado.

- Usando 10 µl del pellet de cada tubo, realizar un extendido en cada lámina, marcar muy bien las láminas con el lápiz de cera o de punta de diamante y dejar secar las láminas al aire.
- Fijar las láminas (incluyendo el control del día anterior) en metanol frío a 4°C durante 10 minutos y dejar secar sobre papel absorbente.
- Tinción fluorescente del acrosoma:
- Colocar 50 µl de solución de trabajo de PISUM-FICT sobre la muestra fijada poniendo gotas a lo largo de la lámina.
- Extender con mucho cuidado sobre toda la muestra usando una punta para micropipeta de 100 µl (sin tocar la muestra porque los espermatozoides fijados pueden desprenderse).
- Incubar las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente poniendo las muestras en una cámara húmeda (humedecer toallas de papel y ponerlas en un recipiente plástico pequeño).
- Enjuagar las láminas con mucho cuidado usando agua de grifo y dejar secar en un recipiente oscuro por 15 minutos.
- Leer en el microscopio de fluorescencia. Los acrosomas se deben observar de color verde fluorescente al evaluar la muestra.
- Realizar la evaluación de la reacción acrosomal contando 200 espermatozoides en cada lámina y teniendo en cuenta los siguientes criterios (ver figura 4.8).



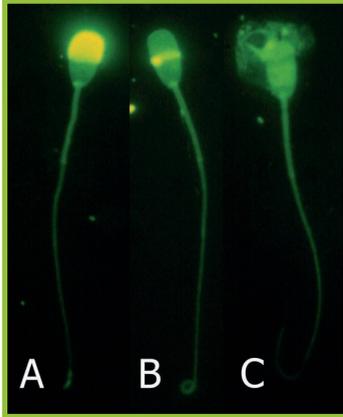
Figura 4.8. Diagrama de la prueba de reacción acrosomal con PISUM-FITC

*Sin reacción:* Se observa el acrosoma intacto. El borde es continuo y liso.

*Reacción parcial:* Se observa el acrosoma parcialmente o el borde es dentado y discontinuo.



*Reacción completa:* Se observa solamente una banda fluorescente en la línea ecuatorial de la cabeza espermática (ver figura 4.9).



**Figura 4.9.** Reacción acrosomal con tinción PISUM-FITC.

- A. Espermatozoide sin reacción;
- B. Espermatozoide con reacción parcial;
- C. Espermatozoide reaccionado.

La reacción acrosomal debe ser evaluada a las 0, 24 y 48 horas con el fin de determinar si esta aumenta con el paso de las horas como ocurre normalmente en el tracto reproductivo de la hembra.

El resultado final se reporta en porcentajes de acuerdo a los tres estados de los espermatozoides anteriormente mencionados. A las 0 horas la cantidad de espermatozoides reaccionados debe ser inferior al 15% y se debe incrementar paulatinamente con el paso de las horas.

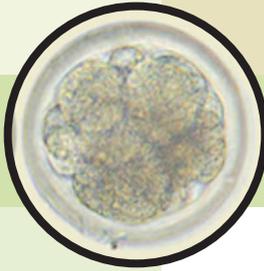
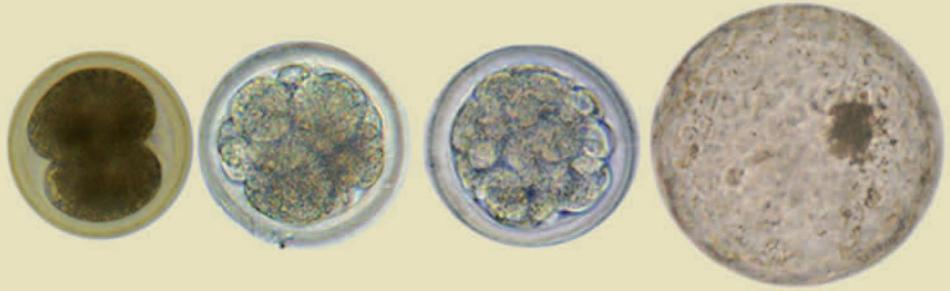




## Bibliografía recomendada

- Berdugo J et al (2000). Perfil espermático de un grupo de pacientes y de voluntarios en Medellín, Colombia. *Rev Urolog Colomb* 9(2): 37-42.
- Betancur J (2008). Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arco iris. *Rev Col Cienc Pec* 21(3): 340-350.
- Fresneda A et al (2004). Espermiación inducida y criopreservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachipomus*). *Rev Col Cienc Pec* 17(2): 46-52.
- Hoyos D et al (2001). Sperm characterization in Agouti paca and Agouti taczanowskii. *Int J Androl* 1(1): 37-41.
- Olivera M et al (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec* 19(4): 426-436.
- Olivera M et al (2006). Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Andrologia* 59(5): 501-510.
- Tabares CJ et al (2004). Evaluation of some inhibitor and activator factors in semen from Brycon henni. *Biol reprod* 70(3): 129-129.
- Tabares CJ et al (2005a). Evaluación de algunos iones sobre la activación de la movilidad espermática y potencial de membrana en Brycon henni. *Rev Col Cienc Pec* 18(3): 335-336.
- Tabares CJ et al (2005b). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev Col Cienc Pec* 18(2): 149-161.
- Tabares CJ et al (2006). Efecto de la pluviosidad y el brillo solar sobre la producción y características del semen en el pez Brycon henni (Pisces: Characidae). *Rev Biol Tropic* 54(1): 179-187.
- Tabares CJ et al (2007). Effect of some ions on sperm activation Brycon henni (Eigenmann 1913). *Acta Biolog Colomb* 12(1): 87-98.
- Urrego R et al (2008). Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Rev Col Cienc Pec* 21(1): 19-26.
- World Health Organization (2010), WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5ª ed., WHO.





# Capítulo 5

## Procedimientos para producción de embriones bovinos *in vitro*

**Autores:** Ángela Patricia López Cardona, Natalia Andrea Gómez Morales, Ariel Marcel Tarazona Morales y Martha Olivera Ángel.

La transferencia de embriones es una biotecnología en crecimiento y ampliamente aceptada a nivel internacional. Los procesos de producción de los embriones tanto *in vivo* como *in vitro* son de especial cuidado, si se tiene en cuenta que el objetivo final de todo el proceso es el nacimiento del mayor número posible de animales sanos. Para tal fin se deben obtener los mejores embriones, los cuales serán seleccionados para la transferencia.

La línea de producción de embriones bovinos *in vitro* fue la línea fundadora del Grupo de Investigación Biogénesis. A partir de este modelo, se ha producido conocimiento básico con respecto a temas como la maduración de oocitos, el metabolismo embrionario (principalmente en cuanto a la actividad mitocondrial), la apoptosis, las moléculas relacionadas con la fertilización y la

genotipificación, y conocimiento técnico, como mejoras en la suplementación de los medios de cultivo y técnicas de fertilización, congelación y vitrificación. Una interesante propuesta consistió en el desarrollo de producción de embriones F1, como aporte a la producción ganadera de nuestra región, aprovechando las ventajas del cruce entre animales puros *in vitro* y la gestación de estos en vacas receptoras criollas o F1. La bibliografía correspondiente a estas publicaciones se encuentra al final de este capítulo.

## Toma de muestras: recolección de ovarios

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para recolectar y transportar ovarios desde la planta de beneficio hasta el laboratorio.
- **Materiales:** Termo de boca ancha, tijeras curvas, guantes de látex, termómetro de punción, bolsas resellables.
- **Indumentaria:** Trabajo en planta de beneficio (ver capítulo 1).
- **Medio:** 500 ml de solución salina (NaCl 0,9%) (ver capítulo 2).

### Procedimiento:

- Llenar el termo con agua corriente a 37°C, verter 100 ml de solución salina (NaCl 0,9%) en la bolsa resellable e introducirla en el termo, cuidando en todo momento que el agua del termo no entre a la bolsa. Mantener la temperatura de la solución salina y del agua del termo lo más cercana posible a 37°C durante todo el procedimiento.
- Seleccionar los ovarios que tengan una buena población folicular, teniendo en cuenta la condición corporal del animal (3-4 en escala de 1-5). En caso de haber preñez, esta no debe exceder los tres meses.
- Cortar los ovarios del tracto reproductivo con unas tijeras curvas, retirando la mayor cantidad de tejido posible, con el fin de dejar solo el ovario (ver figura 5.1).
- Depositar los ovarios dentro de la bolsa con solución salina (ver figura 5.2), cerrar la bolsa y tapar el termo. Verificar constantemente la temperatura y cambiar el agua del termo si es necesario. Nunca se debe depositar agua caliente directamente sobre los ovarios.
- Al finalizar la recolección, sacar la bolsa con los ovarios del termo, retirar con cuidado la solución salina sucia, y lavar dos veces los ovarios con 100 ml de solución salina limpia, para retirar la mayor cantidad de sangre posible.
- Verter suficiente solución salina para cubrir los ovarios (200 ml aprox.), cerrar muy bien la bolsa, y asegurarse de que quede la menor cantidad de aire en ella y que no tenga escapes.



**Figura 5.1.** Retiro de los ovarios bovinos de piezas reproductivas de planta de beneficio.



**Figura 5.2.** Disposición de ovarios bovinos recolectados en planta de beneficio.

- Cambiar el agua del termo e introducir la bolsa con los ovarios, verificar la temperatura y la hora de salida, cerrar muy bien el termo y transportar los ovarios hasta el laboratorio.

*Nota:* El tiempo máximo desde el inicio de la recolección de ovarios hasta la llegada al laboratorio no debe superar las tres horas.

- Al momento de llegar al laboratorio, registrar la hora de llegada y la temperatura de la solución que contiene los ovarios para garantizar que no hubo problemas en el transporte.
- Realizar un último lavado con 200 ml de solución salina, retirar la solución salina sucia del transporte y adicionar solución limpia para el mantenimiento de los ovarios durante la aspiración folicular.
- Colocar los ovarios en el baño serológico precalentado a 37°C y mantenerlos allí durante el proceso de aspiración.

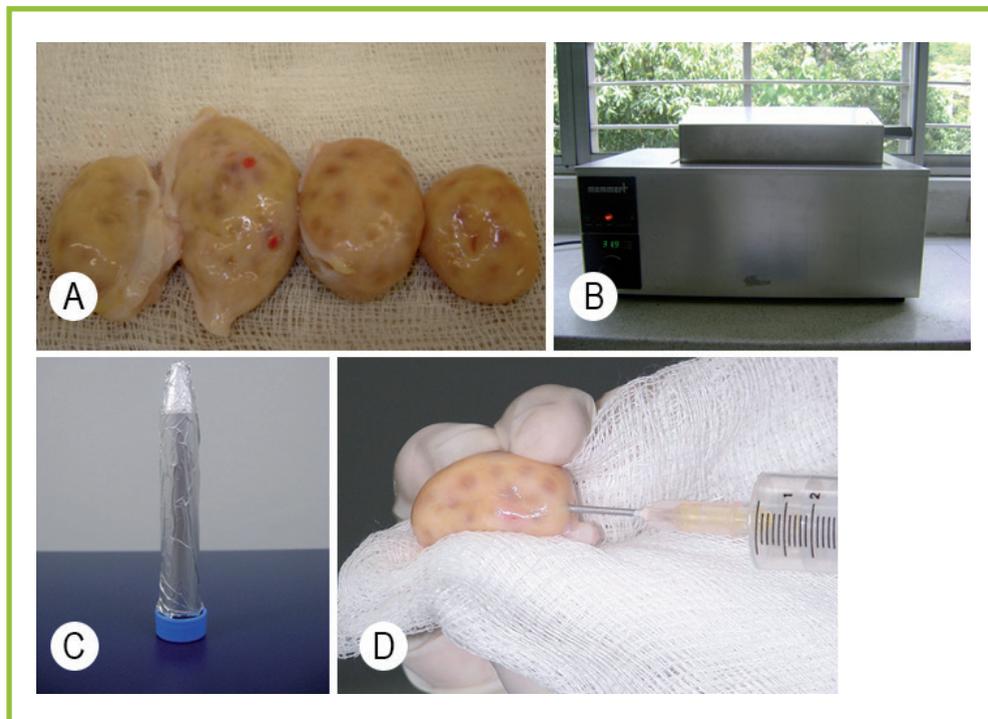
*Nota:* En lo posible, realizar la aspiración de los ovarios inmediatamente lleguen al laboratorio para evitar procesos de hipoxia que vayan en detrimento de la calidad de los oocitos.

## Aspiración folicular

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada de realizar la aspiración de los ovarios para la recuperación de fluido folicular.
- **Materiales:** Ovarios previamente recolectados de la planta de beneficio, baño serológico a 37°C, papel craft, gasa, jeringas de 5 o 10 ml de tres piezas, agujas hipo-

dérmicas 18Gx1<sup>1/2</sup>, tubos cónicos de 15 ml estériles forrados en aluminio, gradilla para tubos y marcador.

- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).



**Figura 5.3.** Materiales para aspiración folicular. A: ovarios, B: baño serológico, C: tubos cubiertos de papel aluminio, D: jeringas y agujas.

Procedimiento:

- Preparar el área de trabajo: determinar dentro del laboratorio un área de aspiración ovárica limpia, de baja luminosidad (sin luz solar directa), y que en lo posible no sea utilizada para el manejo de reactivos y otros agentes biológicos que puedan ser fuentes de toxicidad o contaminación. Colocar sobre el área una capa de papel craft y sobre esta ubicar los materiales necesarios (ver figura 5.3). Colocar los tubos de 15 ml en un soporte dentro del baño serológico para mantener una temperatura constante de 37°C, y cuidar que el agua no toque el borde inferior de las tapas de los tubos.
- Mantener los ovarios en la bolsa con solución salina dentro del baño serológico o en un termo con agua a 37°C durante todo el proceso.



- Tomar un ovario con una gasa y secarlo muy bien.
- Aspirar los folículos entre 2 y 7 mm con la jeringa y la aguja (ver figura 5.4). Dibujar una línea imaginaria sobre el ovario, en la cual se pueda ubicar la mayor cantidad de folículos para aspirarlos con una sola introducción de la aguja (ver figura 5.5). Introducir la aguja por la corteza del ovario y ejercer el mayor vacío posible; sacar la aguja del ovario solo cuando sea estrictamente necesario. La aspiración y el vacío adecuados se caracterizan por un sonido en el momento en que la aguja sale de la corteza ovárica. En lo posible, mantener la menor cantidad de aire en la jeringa.

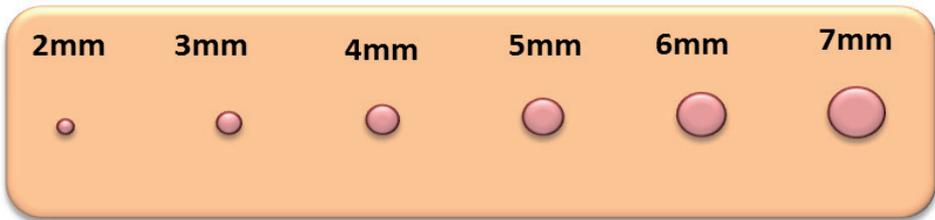


Figura 5.4. Diagrama de diámetros para aspiración folicular de ovarios bovinos.

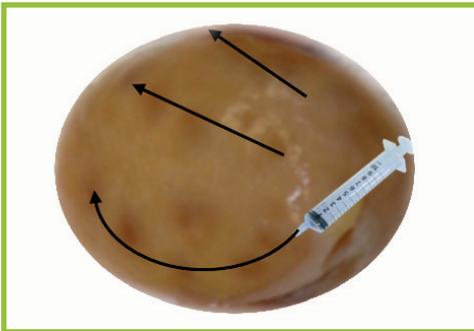


Figura 5.5. Guía de aspiración folicular en ovarios bovinos.

- Al completar entre 4 y 6 ml de fluido en la jeringa, retirar la aguja y depositar el fluido en un tubo cónico de 15 ml, dejándolo deslizar lentamente por la pared del tubo, para no desnudar los oocitos de las células de la granulosa.
- Realizar el mismo procedimiento hasta aspirar la totalidad de los ovarios.
- Al finalizar la aspiración, hacer un conteo de los ovarios aspirados y clasificarlos de acuerdo al tipo de estructura que se observe en ellos (ver figura 5.6), así: OCL: Ovarios con Cuerpo Lúteo, OFD: Ovarios con Folículo Dominante, OCLFD: Ovarios con Cuerpo Lúteo y Folículo Dominante, OSE: Ovarios Sin Estructuras (sin CL o FD). Reportarlos en un formato destinado para ello (ver Anexo 4). La presencia de Folículos Dominantes (FD) y Cuerpos Lúteos (CL) es indicadora de

ciclicidad ovárica, que es importante para tener una buena calidad de oocitos para la maduración *in vitro*.

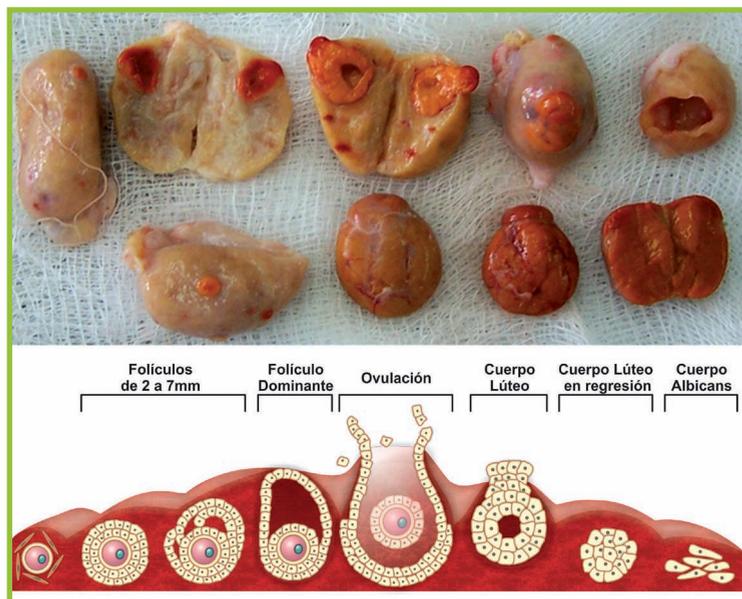


Figura 5.6. Estructuras encontradas en ovarios de bovinos.

## Selección de Complejos Cúmulo-Oocito (CCO) para maduración

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la selección de CCO bovinos aptos para maduración *in vitro*.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml y 50 ml, pipetas Pasteur de cristal de 9", pipeteador, cajas de Petri de 35 y 100 mm, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, puntas para las micropipetas y líquido folicular aspirado.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo Laminar.
- **Medios:** HEPES Talp de trabajo (ver capítulo 2).

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- Preparar una o dos cajas de Petri de 100 mm, y dibujar en el reverso, con un marcador indeleble, una cuadrícula que servirá como guía de búsqueda (ver figura 5.7).

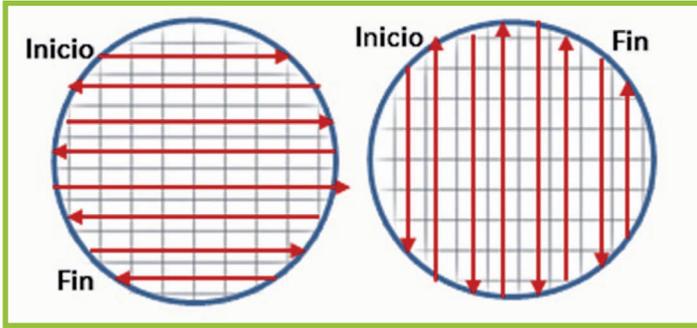


Figura 5.7. Guía de búsqueda de CCO en cajas de Petri.



Figura 5.8. Botón celular decantado de la recolección de fluido folicular.

- Verter 3 ml de HEPES Talp de trabajo, precalentado a 37°C, en el interior de las cajas.
- Con un pipeteador ajustado a una pipeta de Pasteur de cristal, tomar el botón decantado formado en el tubo de fluido folicular (ver figura 5.8). Mover la pipeta suavemente, en forma circular hacia arriba, mientras se aspira el botón.
- Verter el botón de células en la caja con medio y agitar suavemente para distribuir el fluido folicular en toda la superficie.
- Dejar decantar 2 minutos.
- Capturar los CCO con la micropipeta de 10  $\mu$ l, visualizando las cajas en el estereoscopio en un aumento medio. Se debe tratar de tomar la mayor cantidad de CCO por vez, evitando aspirar detritos celulares (ver figura 5.9).

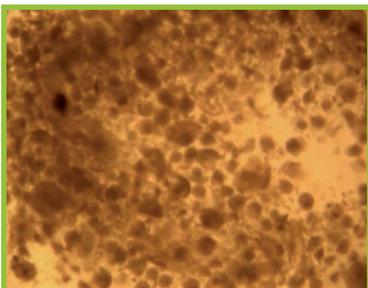
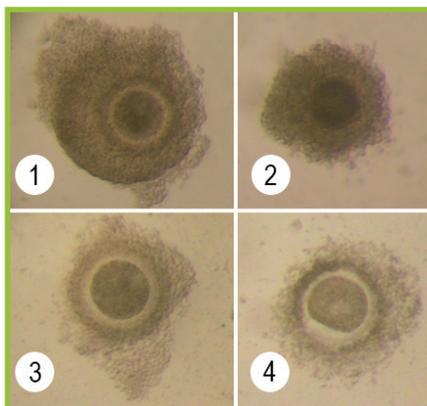


Figura 5.9. Visualización de líquido folicular en el estereoscopio.

**Tabla 5.1.** Calidad morfológica de oocitos bovinos para producción de embriones *in vitro*

Grado 1	Cúmulos de la granulosa con múltiples capas de células compactas. Citoplasma homogéneo y zona pelúcida intacta
Grado 2	Cúmulos de la granulosa con algunas cpas de células compactas. Citoplasma homogéneo con algunas zonas periféricas oscuras y zona pelúcida intacta
Grado 3	Muy poco cúmulos. Citoplasma irregular con zonas oscuras
Grado 4	Sin cúmulos, citoplasma con pignosis ó muy claro, cúmulos de apariencia granular y oscura ó expandido

- Colocar los oocitos recuperados en una caja de Petri de 35 mm con 2 ml de HEPES de trabajo a 37°C.
- Lavar los CCO recuperados. Para esto, se preparan previamente dos gotas de 100 µl de HEPES en una caja de Petri de 60 mm, se pasan los CCO por las gotas de forma sucesiva, y en cada pase se seleccionan los CCO, teniendo en cuenta los parámetros de calidad (ver figura 5.10 y tabla 5.1). Seleccionar únicamente CCO de grados 1 y 2, como se muestra en la figura 5.10.
- Los CCO lavados de excelente calidad se agrupan en una sola gota de medio HEPES de trabajo.

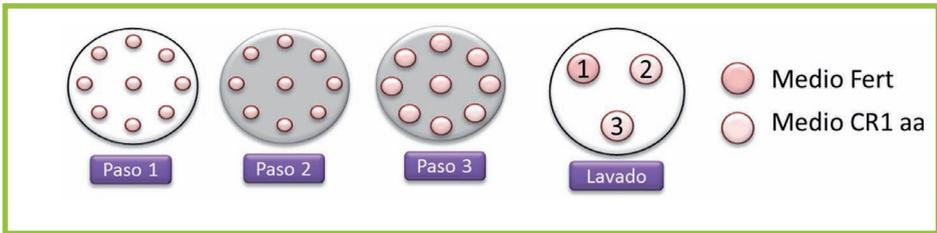
**Figura 5.10.** Clasificación por calidad de CCO bovinos para maduración *in vitro*.

## Maduración *in vitro*, MIV

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la maduración *in vitro* de oocitos bovinos.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 y 50 ml, pipetas de cristal de 10 ml, pipeteador, cajas de Petri de 35 y 60 mm, micropipetas de 10, 100 y 1000 µl, puntas para las micropipetas.



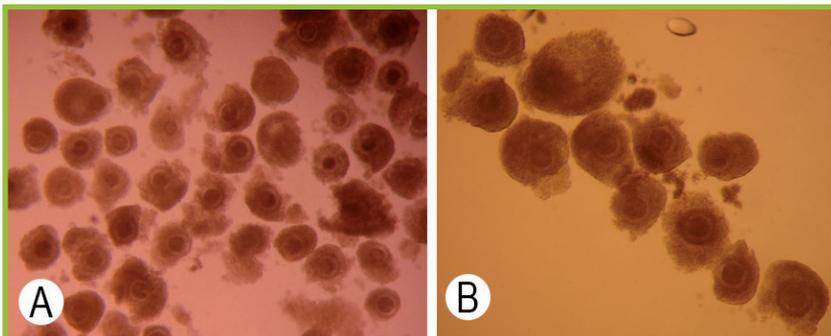
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Aceite mineral y medio de maduración de trabajo (ver capítulo 2), previamente calentados y gasificados en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO<sub>2</sub>.
- **Procedimiento:** En cabina de flujo laminar:
  - Preparar las cajas para la maduración (ver figura 5.11), colocando gotas de 20 µl de medio de maduración (paso 1), cubrir con 3,5 ml de aceite mineral (paso 2) y adicionar a cada gota 30 µl más de medio (paso 3). Marcar las cajas así: MIV, consecutivo del proceso, fecha y número de caja. Guardar la caja en la incubadora de CO<sub>2</sub>. En una caja extra realizar el lavado de los oocitos de la siguiente forma: colocar dos gotas de 100 µl de HEPES y una gota de 100 µl de medio de maduración.



**Figura 5.11.** Diagrama para la preparación de cajas para maduración *in vitro*.

- Tomar los oocitos seleccionados, lavarlos y pasarlos por las dos gotas de HEPES y por la gota con medio de maduración. Finalmente, sembrar entre 10 y 12 oocitos en cada gota de la caja de maduración e incubar por 24 horas a 38,6°C, 6% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad (ver figuras 5.12 y 5.13).

*Nota:* Registrar todo el procedimiento en el formato correspondiente (ver Anexo 4).



**Figura 5.12** A. Primera selección de CCOs, calidades 1, 2 y 3; B. CCOs seleccionados para maduración *in vitro*, calidades 1 y 2.

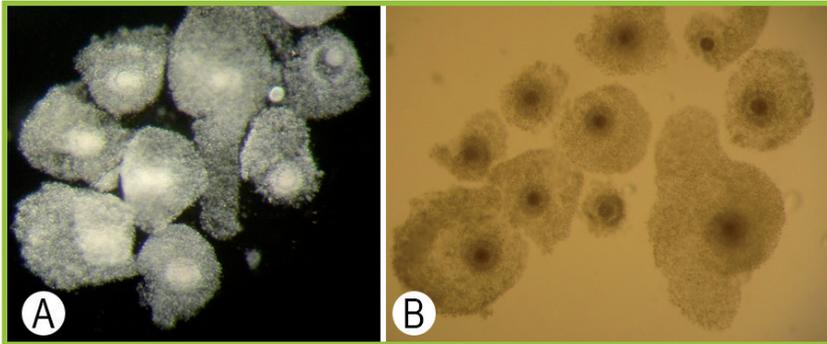


Figura 5.13 A. Expansión de granulosa 24 h de maduración (campo oscuro); B. Expansión de granulosa 24 h de maduración (Campo claro)

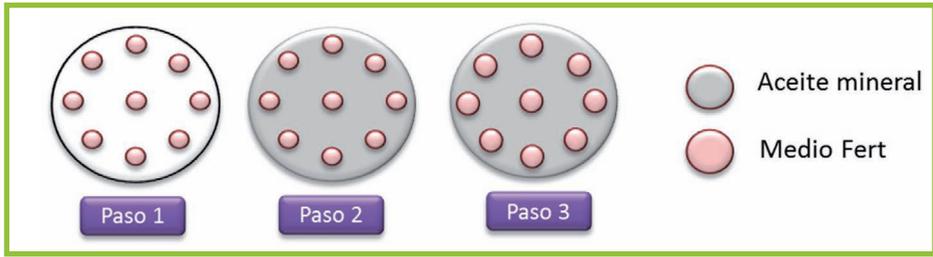
## Fertilización in vitro FIV

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la descongelación adecuada de pajillas de semen bovino criopreservado, la metodología para la selección y capacitación espermática y los procedimientos para la fertilización *in vitro* de oocitos madurados *in vitro*.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, tubos de microcentrífuga de 0,6 y 1,5 ml, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, cajas de Petri de 35 y 60 mm, tijeras rectas, termo plástico o frasco de cristal de boca ancha, cámara de Neubauer, toallas absorbentes de papel, termómetro, cronómetro y alcohol 70%.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Percoll 90%, medio de maduración de trabajo, medio de fertilización de trabajo (ver capítulo 2) y aceite mineral, previamente calentados y gasificados en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO<sub>2</sub>, microcentrífuga, baño serológico.

Procedimiento:

Descongelación:

- Preparar las cajas para la fertilización colocando gotas de 20  $\mu$ l de medio de fertilización en ellas (paso 1), cubrir con 3,5 ml de aceite mineral (paso 2) y adicionar a cada gota 20  $\mu$ l más de medio (paso 3) (ver figura 5.14). Marcar las cajas así: FIV, consecutivo del proceso, fecha y número de caja. Guardar la caja en la incubadora de CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.14** Diagrama de preparación de cajas para fertilización *in vitro*

- Retirar la pajilla del termo de nitrógeno y sumergirla en el baño serológico o en agua a 37°C durante 1 minuto.
- Sacar la pajilla del agua y secarla muy bien con papel absorbente, llevar la pajilla a la cabina de flujo laminar.
- Cortar el extremo sellado por calor con unas tijeras rectas estériles e introducir el extremo cortado en un tubo de microcentrífuga de 600 µl.
- Cortar el otro extremo de la pajilla justo por debajo del tapón de algodón y verter todo el contenido de la pajilla en el tubo.
- Tomar 10 µl de semen, colocarlos sobre un portaobjetos precalentado a 37°C, y llevarlos al microscopio para una evaluación inicial. Observar en un aumento de 10X y evaluar la movilidad inicial (ver capítulo 4) (ver tabla 5.2).

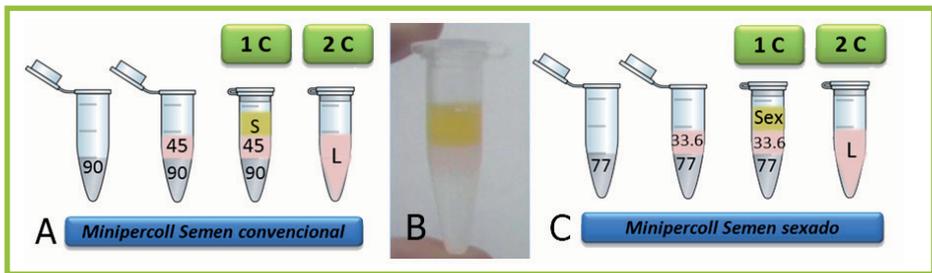
**Tabla 5.2.** Clasificación de la movilidad espermática

Tipo A	Progresiva rectilínea uniforme hacia adelante rápida
Tipo B	Progresiva rectilínea uniforme hacia adelante lenta
Tipo C	Estática

#### Selección y capacitación espermática:

- Preparar el gradiente de Percoll así: en dos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, marcados uno como 90% y el otro como 45%. Verter 400 µl de Percoll 90% y añadir 400 µl de medio de fertilización de trabajo al tubo de 45%. Tomar 400 µl de Percoll 45% y con mucho cuidado depositarlos sobre los 400 µl de Percoll 90% al tubo de 90%, de este modo queda un gradiente de 45/90 (ver figura 5.15 A). Para semen sexado, se deben trabajar los porcentajes de 77 y 33,6% (ver figura 5.15 C).
- Tomar el semen descongelado con la micropipeta de 100 µl y verterlo suavemente sobre el gradiente 45/90, cuidando de no mezclar el gradiente; de esta manera queda una triple columna semen/45/90 (ver figura 5.15 B).

- Centrifugar a 310G por 15 minutos (1C). Al final de la centrifugación se formarán varias capas que de arriba hacia abajo son: diluyente, Percoll 45, franja blanca (contiene los espermatozoides inmóviles retenidos por el gradiente), Percoll 90 y finalmente un botón tenue en el fondo (contiene los espermatozoides móviles).
- Retirar delicadamente todo el sobrenadante con la micropipeta de 1000 µl, y dejar solamente el botón de espermatozoides. Tomar el botón y llevarlo a un tubo de 1,5 ml que contenga 1 ml de medio de fertilización de trabajo (en caso de trabajar con semen sexado, no llevar el botón a otro tubo, y añadir encima del botón 1 ml de medio de fertilización de trabajo); posteriormente, mezclar hasta homogenizar.
- Centrifugar a 210G por 10 minutos (2C). Al final de la centrifugación se formará nuevamente el botón de espermatozoides viables. Retirar delicadamente el sobrenadante dejando solamente el botón de espermatozoides.



**Figura 5.15** A. Diagrama del gradiente minipercoll para semen convencional; B. Gradiente minipercoll preparado; C. Gradiente minipercoll para semen sexado.

### Fallas en el gradiente

- Durante la realización del gradiente de Percoll se pueden presentar fallas debido a problemas en la centrifugación, o en la concentración de los gradientes, lo cual permite que pase una gran cantidad de detritos desde el semen (ver figura 5.16 A). Por otra parte, la presencia de cristales después de la centrifugación del Percoll puede estar indicando fallas en el Percoll 100%, el cual es muy sensible a la cristalización (ver figura 5.16 B).

## Interacción de los gametos

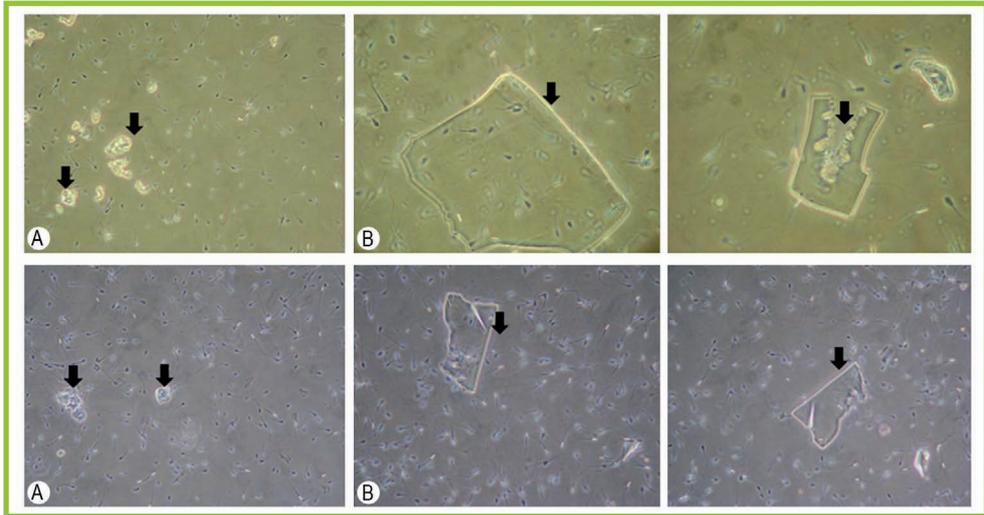
El tiempo de coincubación de los gametos varía según el tipo de semen que se utilice para la fertilización, así: para semen convencional, con un rango de 15 a 18 horas es suficiente para obtener porcentajes por encima del 80% en clivajes, mientras que para el semen sexado el rango aumenta entre 20 a 22 horas, ya que la manipulación adicional que



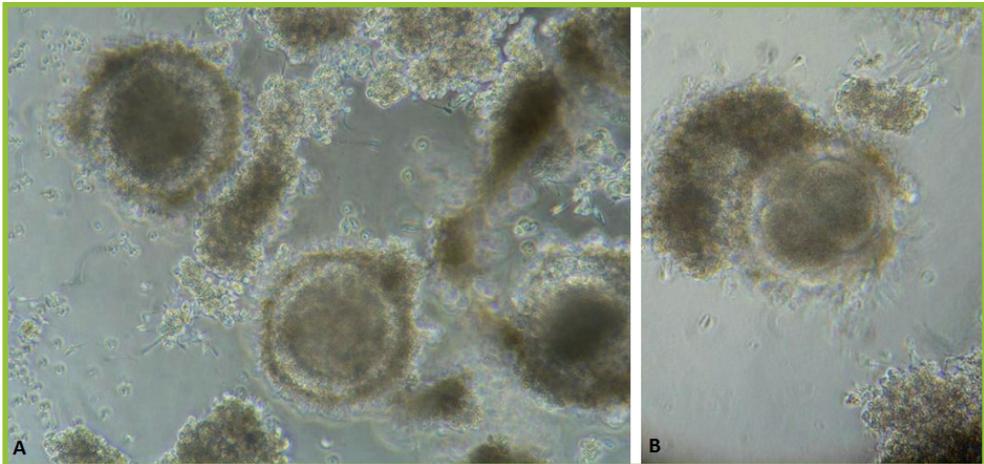
sufren estos espermatozoides disminuye los parámetros de movilidad y vigor haciendo que requieran más tiempo de interacción para una adecuada fertilización (ver figura 5.17).

#### Recuento y dilución espermática para FIV

- Añadir 40  $\mu$ l de medio de fertilización trabajo al botón de semen y homogenizar.



**Figura 5.16.** Muestras de semen para fertilización *in vitro*. A. Espermatozoides pospercoll (las flechas indican la presencia de detritos); B. Espermatozoides pospercoll (las flechas indican la presencia de cristales de Percoll).



**Figura 5.17** A. Oocitos con cúmulo de células de la granulosa y en presencia de espermatozoides durante una fertilización; B. Clivaje de 4 células 18 h posfertilización.

- Diluir 5 µl de este semen (vol. de muestra) en 95 µl de agua dentro de un tubo de microcentrífuga de 600 µl para obtener un volumen final de 100 µl (vol. final de dilución). Es importante tener en cuenta los volúmenes de esta dilución, ya que con ellos se determinará el factor de dilución necesario para el cálculo de concentración. Guardar el semen restante en la incubadora. Colocar 10 µl de la dilución de agua-semen en cada celda de la cámara de Neubauer (ver figura 5.18).
- Realizar el recuento de las dos microcámaras y promediar los resultados.
- Realizar la siguiente fórmula para la concentración de espermatozoides por ml (ver figura 5.20):

*Ejemplo de cómo calcular la concentración espermática con Neubauer para FIV:*

Se tiene una pajilla de 0,5 ml de semen bovino para inseminar 3 cajas de MIV de 9 gotas cada una. Después de realizar los pasos de selección y capacitación espermática previamente explicados, queda un botón de 50 µl de semen. La movilidad inicial (descongelación) fue del 80% y la movilidad después del lavado fue del 60%. La concentración en

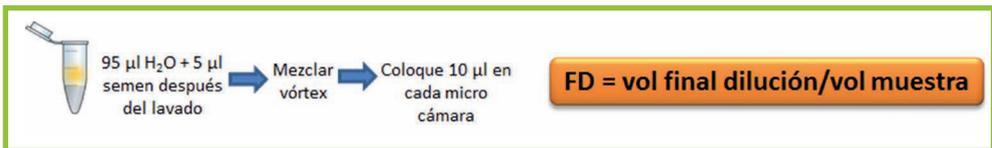


Figura 5.18. Diagrama de dilución de semen para conteo.

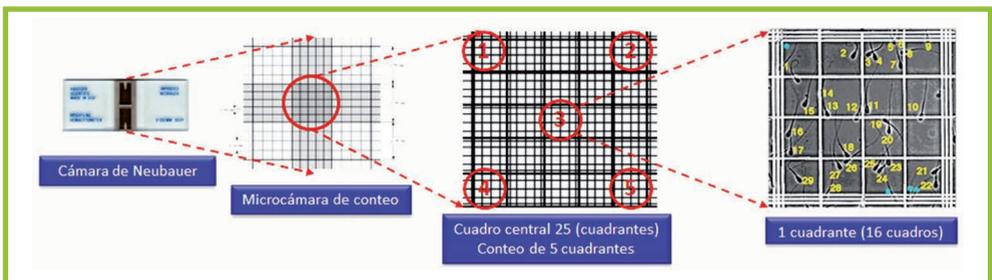


Figura 5.19. Diagrama del uso de cámara de conteo Neubauer.

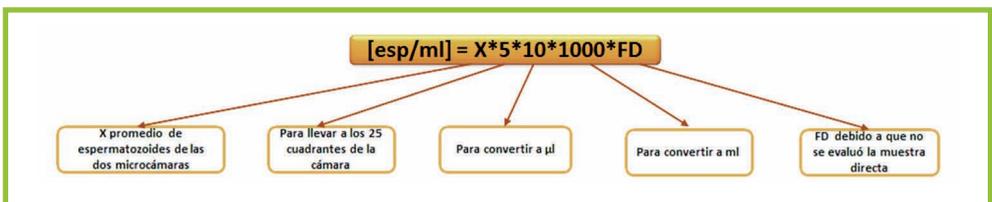


Figura 5.20. Diagrama de la fórmula de cálculo de concentración de espermatozoides.



la cámara de Neubauer fue de 75.000.000 esp/ml y se requiere una concentración de inseminación final de 2.000.000 esp/ml.

1. Cálculo del volumen de semen para inseminar.

Cada gota de 40 µl debe ser inseminada con 10 µl para completar un volumen final de 50 µl. Así, si tenemos una caja de 9 gotas, se necesitan 90 µl de semen, y al ser 3 cajas se requieren 270 µl de semen para inseminar las 3 cajas de MIV. Siempre se recomienda preparar un poco más de semen. Por tanto, para este caso se sugiere preparar 300 µl.

2. Cálculo de la concentración del semen. Solución de trabajo para inseminar.

Cada gota debe ser inseminada con 10 µl (V1), los cuales deben contener la cantidad de espermatozoides suficientes para alcanzar una concentración final de 2.000.000 esp/ml (C2) en la gota de 50 µl (V2); por tanto, hallaremos la concentración a la cual debe estar nuestra solución de trabajo para inseminar utilizando la siguiente fórmula (ver figura 5.21):



Figura 5.21. Diagrama de fórmula para la concentración final de espermatozoides.

Así, tenemos que nuestra solución final de trabajo de 300 µl (V2) debe estar a una concentración final de 10.000.000 esp/ml (C2), y la concentración de la cámara de Neubauer nos dio 75.000.000 esp/ml (C1); por tanto, con la misma fórmula hallaremos el volumen de semen y el volumen de medio que deberemos utilizar para nuestra solución de trabajo de semen (ver figura 5.22).

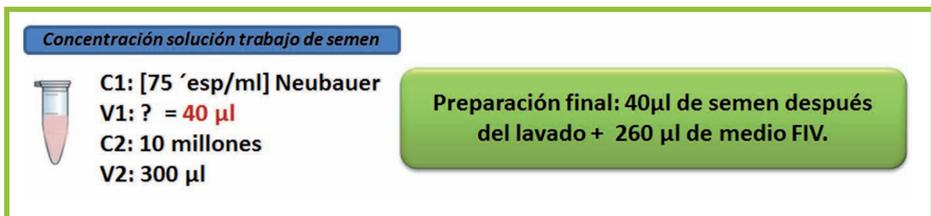


Figura 5.22. Diagrama de preparación de solución de trabajo de semen.

## Inseminación in vitro

- Después de tener lista la dilución con la concentración adecuada para inseminar, sacar la caja de FIV y agregar 10  $\mu\text{l}$  de esta dilución a cada gota; llevar la caja a la incubadora.
- Sacar la caja de MIV y evaluar la maduración según los criterios indicados en tabla 5.3)

**Tabla 5.3.** Calidad de la maduración de los oocitos.

Calidad 3	Expansión total de cúmulos, coloración y estructura homogénea
Calidad 2	Expansión parcial del cúmulos, coloración y estructura homogénea
Calidad 1	poca expansión o ninguna del cúmulos, coloración no homogénea, puede haber algunas células pignóticas

- Retirar las células de cúmulos por medio de pipeteo continuo usando una micropipeta de 100  $\mu\text{l}$ .
- En una caja de Petri de 60 mm, servir 1 gota de 100  $\mu\text{l}$  de medio MIV y 2 gotas de medio de fertilización de trabajo del mismo volumen; en estas gotas, lavar los oocitos desnudados, primero en la gota de MIV y luego en las de medio de fertilización de trabajo (ver figura 5.23). Tener en cuenta que se deben desnudar y lavar los oocitos de cada gota de forma independiente.

**Figura 5.23.** Diagrama de preparación de cajas de lavado.

- Sacar la caja de FIV de la incubadora y pasar los oocitos a esta caja gota por gota. Luego llevar la caja nuevamente a la incubadora y dejar coincubando los gametos entre 18 y 20 horas para semen convencional, y entre 20 y 22 horas para semen sexado.

*Nota:* Registrar todo el procedimiento en el formato correspondiente (ver Anexo 4).

## Cultivo in vitro, CIV

- **Propósito:** Indicar los procedimientos de cultivo para la producción de embriones bovinos *in vitro*.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 35 y 60 mm, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , puntas para las micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Aceite mineral, medio de fertilización de trabajo, medio de desarrollo CR1 AA de trabajo (ver capítulo 2), previamente calentados y gasificados en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de  $\text{CO}_2$ .



Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- Preparar las cajas de cultivo colocando gotas de 20  $\mu\text{l}$  de medio de desarrollo CR1 AA de trabajo, cubrir con 3,5 ml de aceite mineral y adicionar a cada gota 30  $\mu\text{l}$  más de medio. Marcar las cajas así: CIV, consecutivo del proceso, fecha y número de caja. Guardar la caja en la incubadora de  $\text{CO}_2$ . En una caja extra (la cual servirá para el lavado de los oocitos), colocar 2 gotas de 100  $\mu\text{l}$  de medio de fertilización de trabajo y una gota de 100  $\mu\text{l}$  de medio de desarrollo (ver figura 5.24).
- Tomar los oocitos de cada gota de las cajas de fertilización, lavarlos y pasarlos por las dos gotas con medio de fertilización para eliminar el exceso de células de la granulosa y los espermatozoides. Luego, ponerlos en la gota con medio de desarrollo y finalmente sembrarlos en cada gota de la caja de cultivo e incubar.

*Nota:* Registrar todo el procedimiento en el formato correspondiente (ver Anexo 4).

## Evaluación de clivaje y alimentación de embriones bovinos *in vitro*

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la evaluación de clivaje y recambio de medio de cultivo (alimentación) de embriones bovinos *in vitro*.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , puntas para las micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Medio de desarrollo CR1 AA de trabajo (ver capítulo 2), previamente calentado y gasificado en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de  $\text{CO}_2$ .

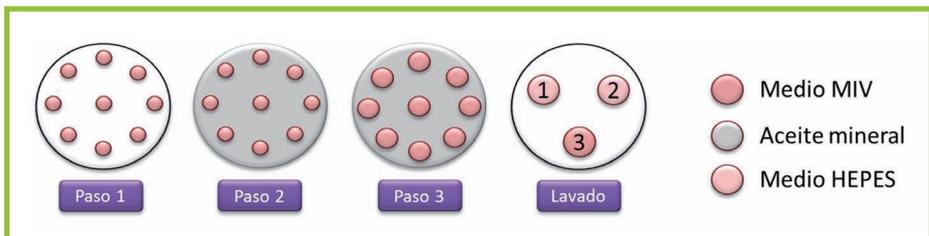


Figura 5.24. Diagrama de preparación de cajas para cultivo *in vitro*.

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- Sacar las cajas para la evaluación de clivaje y la alimentación de los embriones (una vez transcurridas 72 horas de cultivo). Separar primero los embriones de más de cuatro células de los que tengan menor número de blastómeras, que no estén divididos o que presenten características negativas para el desarrollo (como pignosis, irregularidad en los clivajes o daños en la estructura celular) (ver figuras 5.25, 5.26 y 5.27).
- Retirar todos los embriones que fueron evaluados como no aptos, para continuar el cultivo con la mayor cantidad de medio de la gota usando la micropipeta de 100  $\mu$ l.
- Restituir las gotas de cultivo con medio fresco de CR1 AA y llevar la caja a la incubadora para que los embriones de cuatro o más células continúen su desarrollo.

*Nota:* registrar todo el procedimiento en el formato correspondiente (ver Anexo 4).

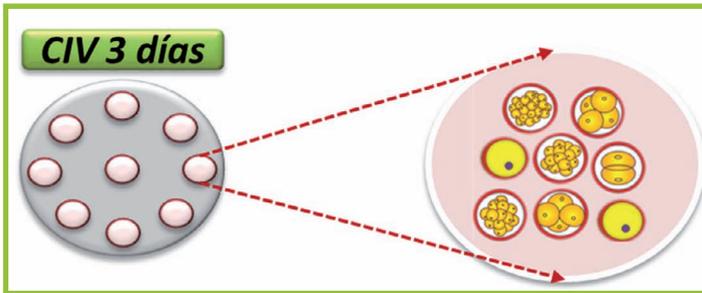


Figura 5.25. Diagrama de células a las 72 horas de cultivo.

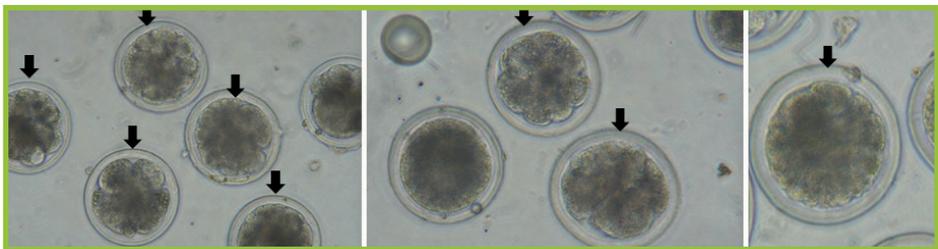


Figura 5.26. Embriones a 72 h poscultivo. Las flechas señalan los embriones clivados con blastómeras uniformes que se tuvieron en cuenta para el porcentaje de clivaje.

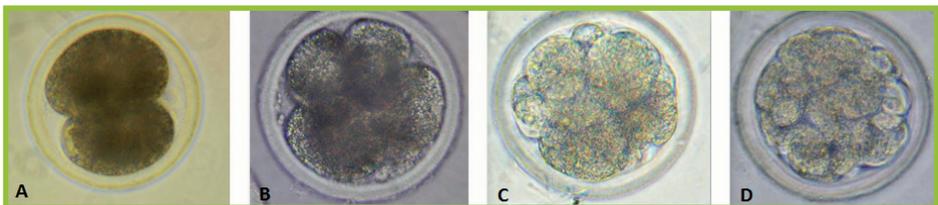


Figura 5.27. A Embrión de dos células; B. Embrión de 6 células; C. Embrión de 8 a 16 células; D. Embrión de 16 a 32 células.



## Evaluación de la producción de embriones

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la evaluación de producción de embriones bovinos *in vitro*.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO<sub>2</sub>.

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- Sacar las cajas para la evaluación de los embriones (transcurridos 7 días de cultivo).
- Identificar los estadios de los embriones, y clasificar, contar y calcular el porcentaje de producción sumando los embriones en estadio transferible (mórula compacta, blastocisto temprano o blastocisto expandido) (ver figuras 5.28, 5.29 y 5.30).
- Se debe evaluar la eclosión a los días 8, 9 y 10 de cultivo. Dicho porcentaje de eclosión es importante, ya que indica la calidad embrionaria y la capacidad de continuidad del desarrollo y de una posible implantación.

*Nota:* Registrar todo el procedimiento en el formato correspondiente (ver Anexo 4).

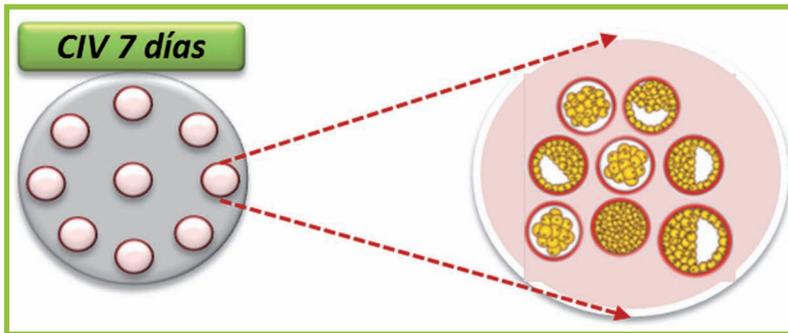


Figura 5.28. Diagrama de embriones el día 7 de cultivo.

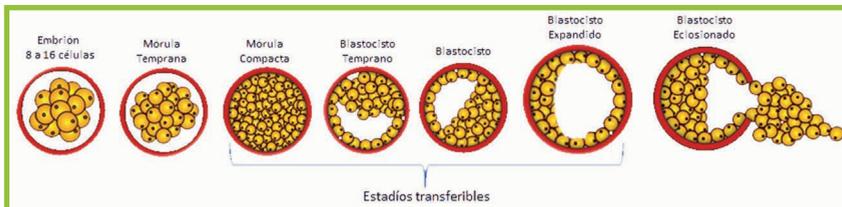
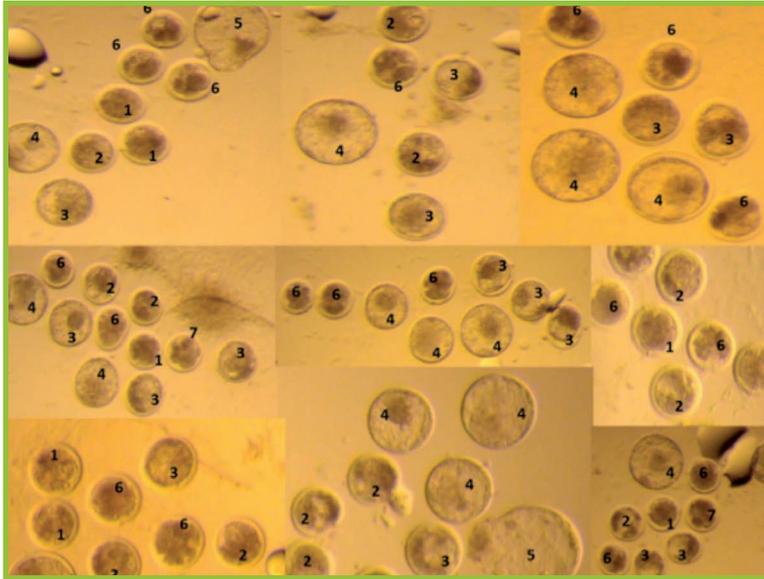


Figura 5.29. Diagrama de estadios de desarrollo embrionario para bovinos, especificando los estadios transferibles al día 7.



**Figura 5.30.** Embriones al día siete de cultivo. 1. Mórulas; 2. Blastocistos tempranos; 3. Blastocistos; 4. Blastocistos expandidos; 5. Blastocistos eclosionando; 6. Degenerados; 7. Detenidos. de cultivo.

### *Proceso de eclosión in vitro*

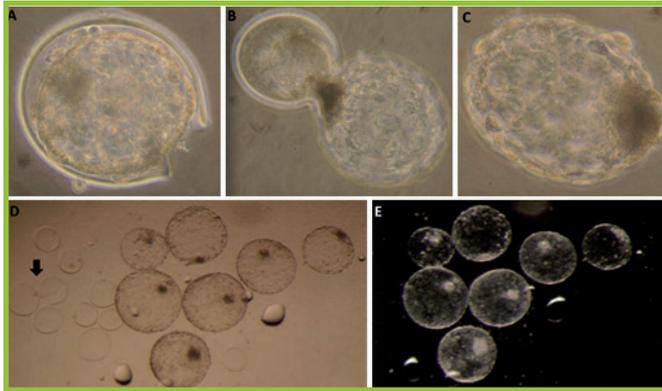
En el modelo bovino *in vitro* la eclosión ocurre entre los días 8 a 10, debido al aumento del número de células, las contracciones del blastocisto y la producción de sustancias que debilitan la zona pelúcida (ver figura 5.31).

### *Progreso poseclosión in vitro*

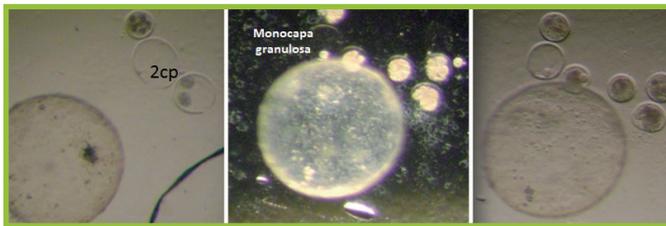
Con la eclosión se puede observar fácilmente la zona pelúcida y, dentro de ella, la presencia de los cuerpos polares o células en extrusión (ver figura 5.32 A), que por algún motivo se separaron de la masa embrionaria durante el desarrollo preimplantatorio.

La evaluación en campo oscuro es importante para detectar contaminaciones; además, con este método de iluminación se puede evaluar la presencia de monocapa de células de granulosa, que ayudan al desarrollo temprano *in vitro* (ver figura 5.32 B-C).

Con el paso de los días y el aumento en la tasa de mitosis, el embrión continúa su desarrollo y expansión, de modo que se presentan embriones de gran tamaño los siguientes días de cultivo (ver figura 5.33). Sin embargo, al no encontrar un nicho de implantación, las células pueden desintegrarse apareciendo de forma dispersa en el medio de cultivo.



**Figura 5.31.** A. Embrión con ruptura inicial de zona pelúcida; B. Embrión eclosionando; C. Embrión eclosionado; D. Embriones eclosionados observados en campo claro, la flecha indica zonas pelúcidas vacías; E. Embriones eclosionados observados en campo oscuro.



**Figura 5.32.** A. Embrión eclosionado, la flecha indica dos cuerpos polares; B. Embriones eclosionados observados en campo oscuro; C. Embriones eclosionados observados en campo claro.



**Figura 5.33.** Embrión bovino eclosionado y reexpandido de 14 días.

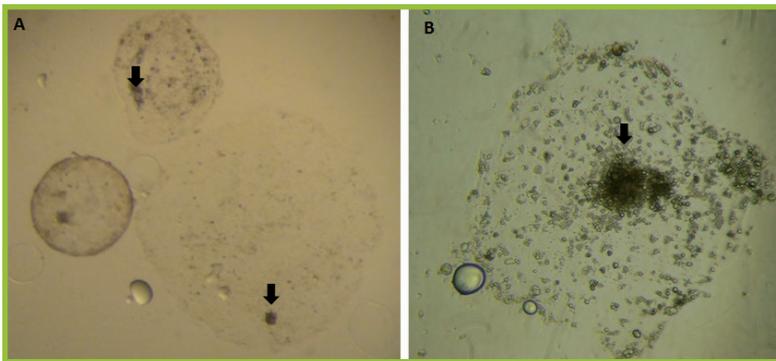
Aunque en algunos casos, debido a la presencia de células de granulosa puede existir una interacción de moléculas de adhesión, se pueden observar embriones que se pegan a las cajas conservando su morfología, de modo que se puede identificar claramente el embrioblasto y el trofoblasto (ver figura 5.34).

## Anormalidades durante el cultivo de embriones

Los medios ácidos pueden causar desprendimiento de zonas pelúcidas y pérdida de embriones (ver figura 5.35).

Las pignosis en las blastómeras pueden ser causadas por el medio o por cambios bruscos de temperatura (ver figura 5.36).

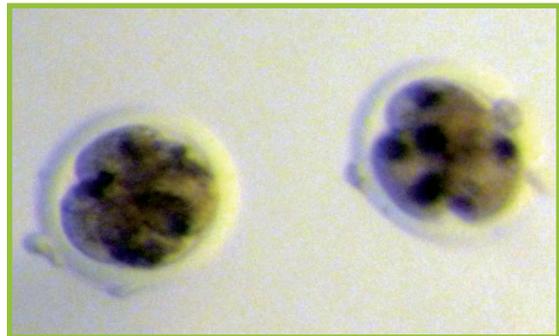
Se pueden producir embriones degenerados e irregulares. Esto puede ser causado por agentes tóxicos (ver figura 5.37).



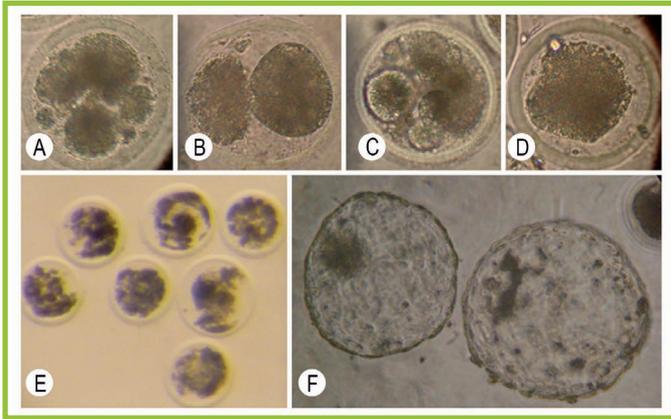
**Figura 5.34.** A. Dos embriones eclosionados adheridos a la caja de cultivo, las flechas indican los embrioblastos; B. Embrión eclosionado y adherido a la caja de cultivo, la flecha indica el embrioblasto.



**Figura 5.35.** Zonas pelúcidas encontradas durante el pipeteo para CIV.



**Figura 5.36.** Embriones pignóticos.



**Figura 5.37.** A-B-C-D. Embriones con clivajes irregulares; E. Embriones degenerados; F. Embrioblasto no uniforme (derecha).

## Empaque y transporte para transferencia de embriones (TE)

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para el empaque de embriones en pajillas de 0,25 ml para transferencia directa y transporte, con el fin de garantizar la viabilidad embrionaria.
- **Materiales:** Pajillas, plugs o tapones para pajillas, cajas de Petri de 35 mm, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, puntas para las micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Medio de cultivo *in vitro* CR1 AA o Holding.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, empacador de pajillas.

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- 1) Evaluar la calidad de los embriones clasificados en estadios transferibles, según se indica en la tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Calidad embrionaria al día 7 de cultivo

<b>Grado 1 (Excelente o buena)</b>	Embrión esférico con blastómeras de tamaño y color uniformes y zona pelúcida intacta, embrioblastos uniformes y localizados, blastocelos bien formados y células trofoectodérmicas periféricas planas
<b>Grado 2 (Regular)</b>	Embrión con alteraciones moderadas en la forma y tamaño de las blastómeras, color no uniforme en algunas células, presencia de pignosis o signos de apoptosis.

- 2) Seleccionar la cantidad de embriones de grado 1 que se van a empacar para ser transferidos, de acuerdo al número de receptoras. Servir 2 ml de medio de CR1 AA en una caja de Petri de 35 mm. Disponer los embriones en esta caja, luego tomar el empacador con la pajilla adaptada y empacar los embriones uno a uno como se ilustra en las figuras 5.38 y 5.39



**Figura 5.38.** Esquema para el empaque de embriones bovinos en la pajilla.

Colocar un lacrador o plug donde se pueda registrar el estadio y la calidad embrionaria, y los datos de los padres. Cuando todos los embriones estén empacados, envolverlos en papel aluminio para evitar la luz directa y colocarlos dentro de una bolsa resellable hermética para evitar ingreso de humedad (ver figura 5.40), en una nevera de poliestireno expandido y con la ayuda de bolsas resellables con gel o agua. Para el mantenimiento de la temperatura durante el transporte, realizar el procedimiento indicado en la figura 5.41 al momento de poner las pajillas en la nevera.



**Figura 5.39.** Empaque de embriones bovinos.



**Figura 5.40.** Envoltura de las pajillas listas en papel aluminio.

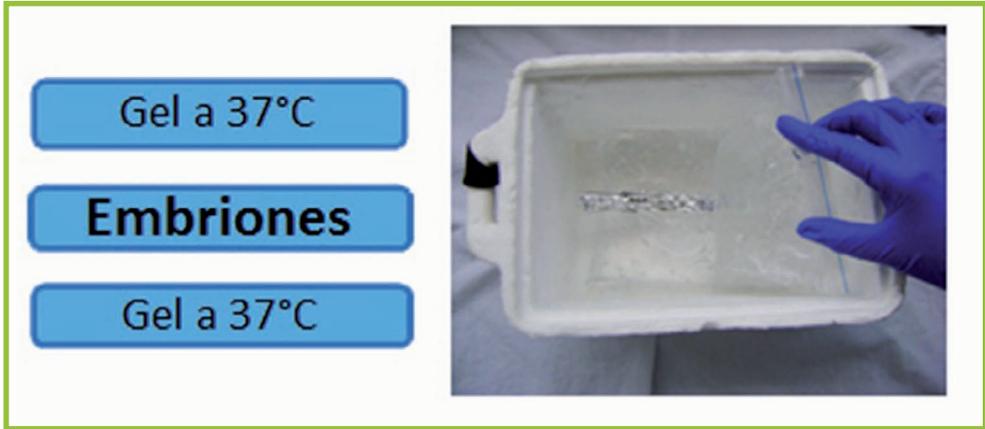


Figura 5.41. Esquema para el empaque de las pajillas en la nevera para el mantenimiento adecuado de la temperatura.

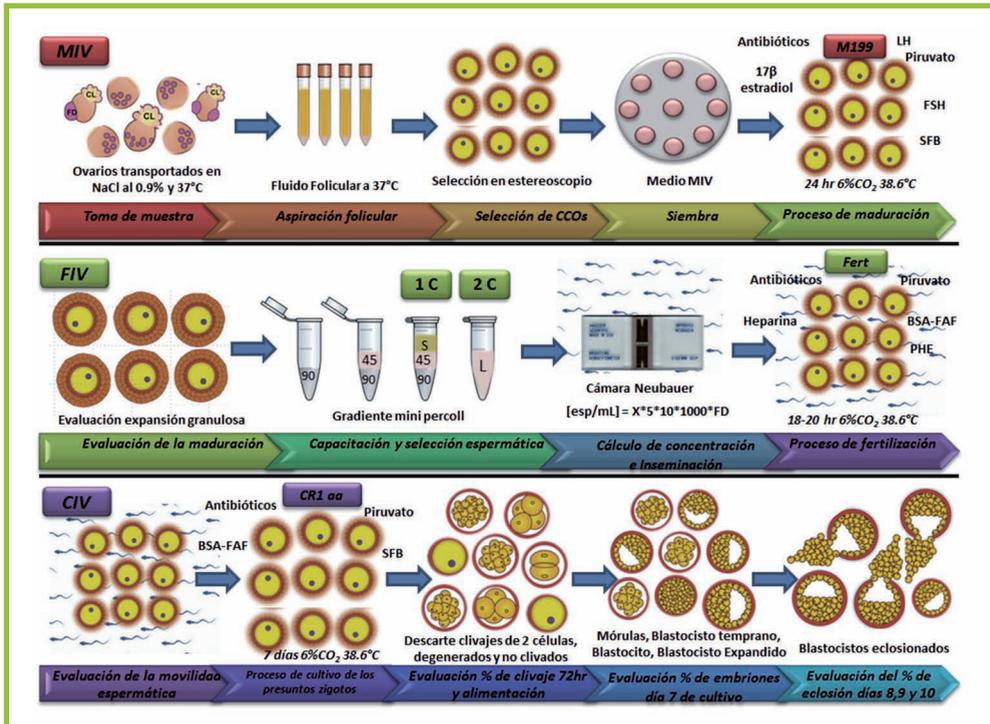


Figura 5.42. Modelo ilustrativo de los procesos principales para la producción de embriones bovinos in vitro.

## Anexo 4. Formatos de producción de embriones in vitro

### MATADERO Y MADURACIÓN IN VITRO

Fecha					
Responsable					
Proceso					
Matadero	Hora de Salida		Hora Inicial Asp		
	Hora de Llegada Al Laboratorio		Hora Final Asp		
	Tiempo Llegada		Hora de Siembra		
Aspiración	Total Ovarios	Cuerpo Luteo	Fol. Dominante	Sin Estructuras	Cl+Fd
Selección	Numero Total de Coc				

Medio de Miv

Mapa

Observaciones:

--

--

### FERTILIZACIÓN IN VITRO

Fecha					
Responsable					
Proceso					
Hora Inicial		Medio			
Hora Final		Evaluación Miv			



Método de Lavado								
Toro		Mov Inicial	Mov Final	C1 X10 <sup>6</sup>	C2 X10 <sup>6</sup>	V1	V2	Final X10 <sup>6</sup>

Mapa

Observaciones:

---



---



---

### CULTIVO IN VITRO

Fecha				
Responsable				
Proceso				
Hora Inicial		Medio		
Hora Final				

Mapa

Observaciones:

---



---



---

## FEEDING Y EVALUACIÓN

Fecha										
Responsable										
Proceso										
Hora Inicial					Medio					
Hora Final										
G	Cliv	Queda	Observaciones	Mt	Mo	Bt	Bx	Be	Bex	Observaciones



## Bibliografía recomendada

- Arias C et al (2007). Efecto de la suplementación con alanina y glicina sobre los clivajes iniciales de embriones bovinos producidos in vitro. *Rev MVZ Córdoba* 12(2): 1020-1027.
- Camargo O et al (1999). Radicales libres y desarrollo embrionario. *Rev Col Cienc Pec* 12(2): 108-118.
- Camargo O et al (2008). Modelo teórico para explicar la acumulación de gotas lipídicas en embriones bovinos machos o hembras producidos in vitro. *Acta Biolog Colomb* 13(2): 91-104.
- Gómez N et al (2013). Efecto del ácido linoléico conjugado sobre la proporción de sexos y calidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Archivos de Medicina Veterinaria* 45: 17-24.
- Jiménez C et al (1991). Congelación de embriones de ratón de ocho células con dos métodos de remoción del crioprotector. *Acovez* 15(1): 19-22.
- Lenis Y (2009). Efecto de la osmolaridad sobre el diámetro y la calidad de oocitos bovinos madurados in vitro. *Rev Lasallista Invest* 6(1): 58-66.
- Olivera M (2003). Producción de embriones F1 BON, para la caracterización del doble propósito y como apoyo a las cadenas láctea y cárnica. *Rev Col Cienc Pec* 16(1): 78-82.
- Olivera M (2005). Cinética de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en embriones bovinos producidos in vitro y su efecto sobre actividad mitocondrial. *Redvet* 6(5): 50522-50523.
- Olivera M (2009). Efecto de la suplementación del medio de maduración con ácido linoléico sobre las tasas de clivaje en embriones bovinos producidos in vitro. *Rev Col Cienc Pec* 22(3): 386-386.
- Olivera M et al (2008). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Rev Col Cienc* 21(3): 398-405.
- Olivera M y Berdugo J (1990a). Obtención y clasificación de oocitos bovinos para el programa de fertilización in vitro. *Acovez* 14(3): 22-26.
- Olivera M y Berdugo J (1990b). Obtención, evaluación y maduración in vitro de oocitos porcinos. *Acovez* 14(1): 13-17.
- Olivera M y Serrano C (2003). Determinación del ciclo celular de embriones bovinos producidos in vitro. *Taurus* 5(20): 20-35.
- Olivera M y Sierra R (2000). Interacción entre gametos: ¿el espermatozoide cómo lo logra? *Anim Reprod Sci* 13(2): 143-147.
- Olivera M y Tarazona A (2003a). Actividad mitocondrial en blastocistos bovinos cultivados in-vitro. *Rev Col Cienc Pec* 16(3): 30.
- Olivera M y Tarazona A (2003b). Actividad mitocondrial en células de la corona radiada de oocitos caninos. *Rev Col Cienc Pec* 16(3): 30.
- Serrano C et al (2002). Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Rev Col Cienc Pec* 15(3): 286-292.
- Sierra RA et al (2000). Selección, cultivo y agrupamiento de embriones bovinos. *Rev Col Cienc Pec* 13(2): 143-147.
- Tarazona A et al (2005). Relationship between mitochondrial activity, endogen hydrogen peroxide and apoptosis in oocytes competent and non-competent early bovine in vitro produced embryos. *Biol reprod* 72(3):152-152.
- Tarazona A et al (2006). Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Domestic Anim* 45(1): 5-11.
- Tarazona A et al (2007a). Criopreservación de oocitos y embriones: Parte I: Propiedades criológicas de los fluidos. *Rev Col Cienc Pec* 19(1): 100-109.

- Tarazona A et al (2007b). Criopreservación de oocitos y embriones: Parte II: procedimientos y protocolos. *Rev Asoc Colomb Ciencs Biol* 19(1): 110-125.
- Urrego R et al (2005). Simplificación de la fertilización de oocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Rev Col Cienc Pec* 18(3): 339-339.
- Vélez C et al (2007). Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF- $\kappa$ B and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology* 67(1): 1285-1296.



## Capítulo 6

### Procedimientos para el sexaje de embriones bovinos por PCR

**Autores:** Luisa Fernanda Ortiz Román  
y Diana Maritza Echeverry Berrío

En los casos en los que no se puede realizar fertilización con semen sexado para obtener animales con el sexo requerido según las necesidades, el sexaje de embriones mediante la técnica de PCR puede ser una herramienta útil antes de transferir los embriones, aunque es una metodología aún en perfeccionamiento, especialmente en cuanto a la toma de la muestra del embrión. El sexaje por PCR es especialmente útil en procesos de investigación en los cuales se requiere determinar el sexo de los embriones obtenidos (por ejemplo, cuando se utilizan aditivos en los medios y se quiere determinar su efecto sobre la proporción de sexos). En este capítulo se describen los pasos básicos para el sexaje de embriones bovinos por PCR.

## Remoción de zona pelúcida de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para la remoción de zona pelúcida de embriones bovinos para obtener material genético con fines de diagnóstico molecular
- **Materiales:** Termo de boca ancha, tijeras curvas, guantes de látex, termómetro, tubos cónicos de 50 ml, hielo, overol, botas, casco y gorro blancos.
- **Medios:** solución con pronasa 0,5%, PBS suplementado con PVP al 0,3%, solución de lisis (RTL) (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).

El proceso de remoción de zona pelúcida se debe realizar con el fin de evitar que los espermatozoides adheridos en la zona pelúcida interfirieran con los resultados del sexaje, dando falsos machos positivos.

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- Seleccionar los embriones en estadio transferible (mórula compacta, blastocisto temprano, blastocisto expandido) o aquellos a los que se les desee realizar extracción de DNA o RNA.
- Lavar cada embrión pasándolo por 4 gotas de 100 µl de PBS suplementado con PVP al 0,3%.
- Pasar a una gota de 100 µl de solución de pronasa al 0,5% durante 2 a 5 minutos en observación permanente bajo estereoscopio, vigilando constantemente los cambios en la zona pelúcida.
- Al presentar cambios que indiquen degradación, pasar inmediatamente a una gota de 100 µl de PBS+PVP al 0,3% y pipetear manualmente hasta desprender la zona pelúcida restante.
- Tomar las células embrionarias y pasar a tubos de micro centrífuga de 1,5 ml con 20 µl de solución de lisis (RTL) activada.
- Almacenar a -80°C hasta el momento de su procesamiento. (ver figura 6.1)

## Purificación de ADN total a partir de células

- **Propósito:** Explicar los procedimientos para la purificación de DNA total a partir de células de embriones bovinos producidos *in vitro*.

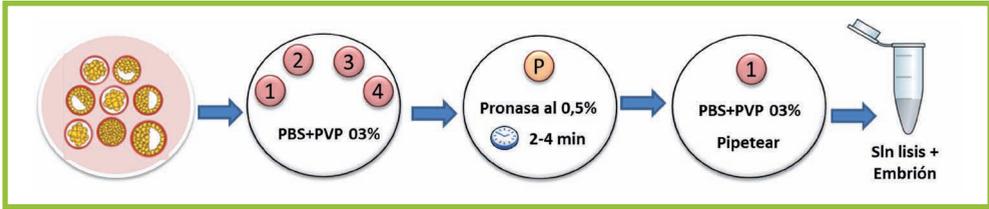


Figura 6.1 Diagrama de remoción de zona pelúcida.

- **Materiales:** Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ l, puntas para las micropipetas, kit Dneasy Blood & Tissue, etanol puro, PBS 1X.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, centrífuga, baño serológico, vórtex.

Procedimiento previo a la extracción:

En cabina de flujo laminar:

- Adicionar 125 ml de etanol al 100% al buffer AW1 para obtener 220 ml de buffer, y 160 ml de etanol al 100% para obtener 226 ml de buffer AW2 (ver figura 6.2).

Procedimiento de extracción:

En cabina de flujo laminar:

1. A los embriones resuspendidos en solución de lisis en un tubo de 1,5 ml, agregar 200  $\mu$ l de PBS 1X y 20  $\mu$ l de proteinasa K y mezclar varias veces (ver figura 6.3 A).



Figura 6.2. Activación de buffers AW1 y AW2.

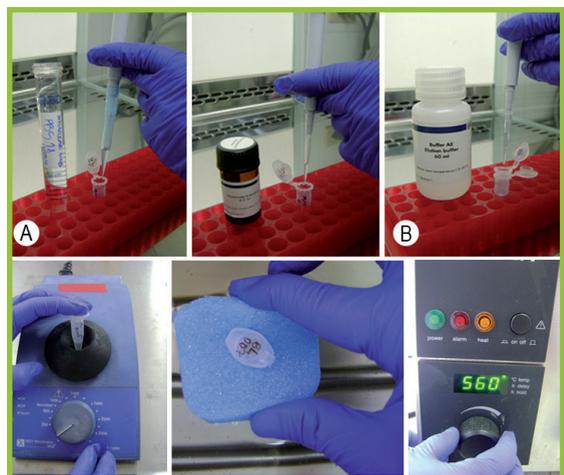
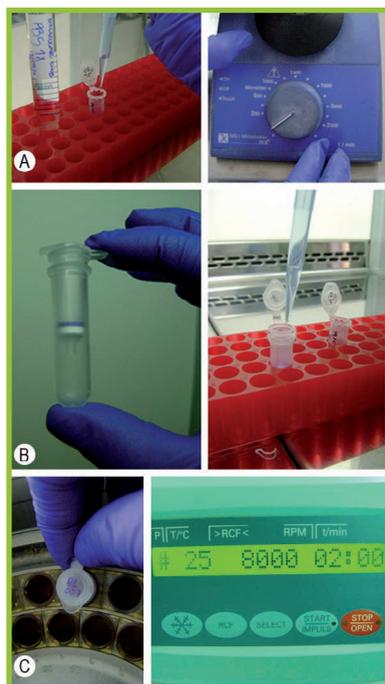


Figura 6.3 A. Adición de PBS y proteinasa K; B. Adición de buffer de lisis e incubación de la muestra.



**Figura 6.4** A. Adición de etanol 100% y vórtex para homogenizar; B. Columna Mini Dneasy; C. Número de revoluciones por minuto (RPM) en centrifuga.



**Figura 6.5.** A. Transferencia de columna a tubo de colección; B. Número de revoluciones por minuto (RPM) en centrifuga y descarte de tubo de colección.

2. Adicionar 200  $\mu$ l de buffer de lisis AL, agitar en el vórtex e incubar en el baño serológico a 56°C durante 10 minutos, temperatura en la cual la proteinasa K es funcionalmente activa (ver figura 6.3 B).
3. Pasados los 10 minutos, retirar los tubos del baño serológico, agregar 200  $\mu$ l de etanol al 100% a la muestra y mezclar por vórtex. Es importante que la muestra y el etanol se encuentren bien homogenizados (ver figura 6.4 A).
4. Con una micropipeta de 1000  $\mu$ l, tomar la mezcla y transferirla a la columna Mini Dneasy (ver figura 6.4 B).
5. Centrifugar a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos y descartar el tubo dejando libre la columna (ver figuras 6.4 C y 6.4 A).
6. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección y agregar 500  $\mu$ l de buffer de lavado AW1 (ver figura 6.5 A).
7. Centrifugar nuevamente a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos, y descartar de nuevo el tubo dejando libre la columna (ver figura 6.5 B).
8. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección y agregar 500  $\mu$ l de buffer de lavado AW2 (ver figura 6.6 A).
9. Centrifugar a 20000 xg (14000 rpm) durante 4 minutos (ver figura 6.6 B).
10. Transferir la columna a un tubo de micro-centrífuga de 1,5 ml y agregar 50  $\mu$ l de buffer de elusión AE (ver figura 6.6 C).
11. Centrifugar a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos y adicionar nuevamente 50  $\mu$ l de buffer de elusión, centrifugar por última vez a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos y descartar la columna (ver figura 6.7).
12. Guardar el DNA a -80°C para ser empleado en la PCR.



**Figura 6.6** A. Adición de buffer de lavado; B. Número de revoluciones por minuto (RPM); C. Retiro de columna y adición de buffer de elusión.



**Figura 6.7.** Paso final en la elusión del DNA

## Amplificación de DNA total para sexaje de embriones

**Propósito:** Explicar los cálculos y pasos a realizar en la PCR para determinar el sexo de los embriones.

- **Materiales:** Tubos de microcentrífuga de 0,2 ml, micropipetas de 2, 20, 100 y 1000 µl, puntas libres de nucleasas para las micropipetas,
- **Reactivos:** Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), Taq buffer con KCl, dNTP (dinucleótidos trifosfato), Taq polimerasa, primer BOV97M (F), primer BOV97M (R), primer satélite 1,715 (F), primer satélite 1,715 (R), agua destilada desionizada estéril.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar

Procedimiento: Antes de iniciar:

- Limpiar con abundante alcohol la cabina y las micropipetas, y dejar todos los materiales a emplear bajo luz UV por 15 minutos.

- Los primers empleados en la reacción de amplificación se reconstituyen con agua libre de nucleasas a una concentración de 100 mM. Para ello hay que agregar 10 veces la cantidad de nanomoles en agua; por ejemplo, si estos vienen a 36,5 nanomoles, para dejarlos a 100 mM se agrega 360  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.
- Una vez reconstituidos los primeros, preparar una solución de trabajo a 10 mM.
- Los dNTP se preparan también a una concentración de 10 mM para emplearlos como solución de trabajo en la PCR; para ello se emplea la fórmula:  
V1: volumen que se desea encontrar  
C1: concentración de la que se parte, para el caso de los dNTP sería 100 mM  
V2: volumen total de la reacción  
C2: concentración final que se desea obtener

#### Cálculos:

Entendiendo que, normalmente, a la hora de remitirse a los procedimientos de una PCR, esta siempre se expresa en términos de concentración, hay que tener en cuenta una serie de cálculos a realizar para saber el volumen a tomar de cada uno de los reactivos empleados.

La mezcla de la reacción en la PCR para el sexaje de los embriones contiene:

- 2,5 mM de  $MgCl_2$
- 1X de Taq buffer con KCl
- 0,2 mM de cada dNTP (adenina, timina, guanina, citocina)
- 0,3 mM de cada primer BOV97M
- 0,06 mM de cada primer satélite 1,715
- 1 Unidad de Taq polimerasa
- 17,6  $\mu$ l del DNA molde

Entonces, empleando la fórmula anteriormente descrita,  $V_1C_1 = V_2C_2$ , es necesario calcular el volumen a emplear así:

Para el  $MgCl_2$

V1 = volumen a encontrar  
C1 = 25 mM (concentración a la que viene el cloruro de magnesio)  
V2 = 25  $\mu$ l (volumen final para la PCR)  
C2 = 2,5 mM  
 $V_1 = 25 \mu l * 2,5 \text{ mM} / 25 \text{ mM}$   
V1 = 2,5  $\mu$ l



*Nota:* Los cálculos se realizan para una muestra (ver tabla 6.1), pero dicho valor se multiplica por el número de muestras a procesar.

**Tabla 6.1** Concentración de los reactivos empleados en la PCR

Reactivo	Concentración	Volumen
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5 µl
Taq buffer con KCl	1X	2,5 µl
Di nucleótidos trifosfato (dNTP)	0,2 mM	0,5 µl
Primer BOV97M (F)	0,3 mM	0,75 µl
Primer BOV97M (R)	0,3 mM	0,75 µl
Primer satélite 1,715 (F)	0,06 mM	0,15 µl
Primer satélite 1,715 (R)	0,06 mM	0,15 µl
Taq polimerasa	1 U	0,2 µl
DNA		17,6 µl

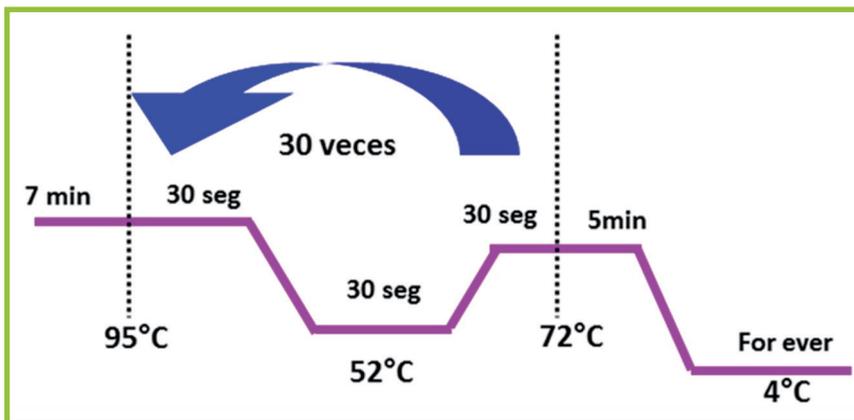
Procedimiento para la PCR:

En un tubo de 1 ml agregar cada uno de los reactivos. Es recomendable agregar por último la Taq polimerasa, para evitar reacciones inespecíficas.

Después de agregar cada reactivo, mezclar por pipeteo y cambiar de punta.

Una vez mezclados todos los reactivos de la Mix, agregar el DNA en un lugar fuera de la cabina de PCR.

Finalmente, llevar los tubos para el termociclador y configurar el siguiente perfil térmico (ver figura 6.8):



**Figura 6.8.** Esquema de perfil térmico en la PCR.

### Procedimiento para la reamplificación de PCR

Dado que la concentración de DNA extraído de cada embrión es tan baja ( $\approx 8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ), es necesario hacer una reamplificación para poder obtener un alto número de copias visibles bajo luz UV.

En un tubo de 1,5 ml agregar los reactivos que se indican en la tabla 6.2:

**Tabla 6.2** Concentración de los reactivos empleados en la reamplificación

Reactivo	Concentración	Volumen
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	2,5 $\mu\text{l}$
Taq buffer con KCl	1X	2,5 $\mu\text{l}$
Di nucleótidos trifosfato (dNTP)	0,2 mM	0,5 $\mu\text{l}$
Primer BOV97M (F)	0,27 mM	0,675 $\mu\text{l}$
Primer BOV97M (R)	0,27 mM	0,675 $\mu\text{l}$
primer satélite 1,715 (F)	0,06 mM	0,15 $\mu\text{l}$
primer satélite 1,715 (R)	0,06 mM	0,15 $\mu\text{l}$
Taq polimerasa	1 U	0,2 $\mu\text{l}$
DNA		3 $\mu\text{l}$
Agua destilada desionizada estéril		14,85 $\mu\text{l}$

Una vez realizada la Mix (toda la mezcla sin el DNA), agregar 24  $\mu\text{l}$  de esta a cada tubo de PCR. Finalmente, agregar 2  $\mu\text{l}$  del producto de PCR anterior a cada tubo y llevar al termociclador con el mismo perfil térmico de la primera PCR.

Nota: Es importante que la Mix se realice en un lugar con luz UV, ya sea una cabina de bioseguridad o un cuarto, pero el DNA se agrega fuera de este sitio para evitar contaminaciones.

## Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

- **Propósito:** Indicar los pasos a seguir para el revelado del producto de PCR.
- **Materiales:** papel parafilm, micropipeta de 20  $\mu\text{l}$ , puntas libres de nucleasas estériles, erlenmeyer de 100 ml.
- **Reactivos:** buffer TAE 1X (ver capítulo 2), marcador de peso molecular de 50 bp, DNA loading buffer dye 6X.
- **Equipos:** balanza, cámara de electroforesis, fuente de poder, fotodocumentador.



### Procedimiento:

- Pesar en una balanza 1,5 gr de agarosa grado molecular y ponerla en un erlenmeyer de 100 ml (ver figura 6.9 A).
- Adicionar 100 ml de buffer TAE 1X (ver figura 6.9 B).
- Calentar la mezcla hasta que quede homogenizada por completo (ver figura 6.9 C)
- Enfriar en agua para reducir la cantidad de vapores (ver figura 6.10 A)
- Agregar 10  $\mu$ l de bromuro de etidio a una concentración de 5 mg/ml y mezclar suavemente (ver figura 6.10 B).

Con cuidado y sin inhalar los vapores, depositar la mezcla en la cubeta de electroforesis y colocar suavemente la peineta (ver figura 6.10 C).

### Una vez realizado el gel:

- Retirar la peineta, con cuidado de no dañar los pozos (ver figura 6.11 A).
- Agregar dentro de la cubeta buffer TAE 1X hasta cubrir los pozos del gel (ver figura 6.11 B).



**Figura 6.9** A. Medición de la cantidad de agarosa; B. Adición de buffer TAE; C. homogenización de la agarosa.



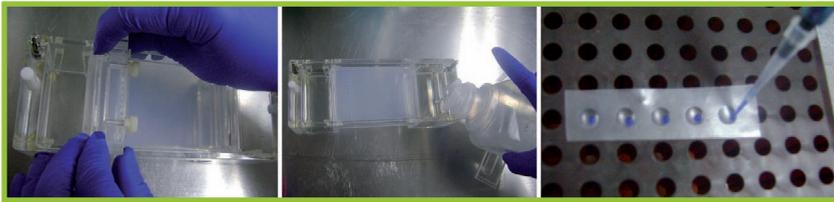
**Figura 6.10** A. Reducción de vapores; B. Adición de bromuro de etidio; C. Adición de la mezcla en la cama de electroforesis.

- Sobre el papel parafilm, agregar 3  $\mu$ l de DNA loading buffer dye 6X y 20  $\mu$ l del producto de PCR (el reamplificado) y mezclarlo con el DNA loading buffer dye 6X (ver figura 6.11 C)
- Sembrar 3  $\mu$ l de marcador de peso molecular en el primer pozo del gel seguido, y sembrar la mezcla de la muestra con el dye 6X en el gel (ver figura 6.12 A).
- Instalar los electrodos de la cámara de electroforesis: rojo con rojo y negro con negro en la fuente de poder (ver figura 6.12 B).
- Correr el gel a 60 V durante 40 minutos (ver figura 6.12 C)

*Nota:* la presencia de burbujas en la cámara de electroforesis indica que la energía eléctrica está correctamente conectada.

Pasados los 40 minutos, retirar cuidadosamente la tapa de la cámara de electroforesis, retirar el gel y situarlo en el fotodocumentador.

Encender la luz UV y observar el amplificado. La presencia de dos bandas (141 bp y 216 bp) indica que el embrión es macho, y la presencia solo de la banda de 216 bp indica que es hembra (ver figura 6.13).



**Figura 6.11** A. Retiro de peinetá; B. Adición de buffer TAE en la cámara de electroforesis; C. Mezcla dye con el producto de PCR.



**Figura 6.12** A. Siembra de muestras en el gel; B. Instalación de electrodos en la cámara; C. Regulación del voltaje.



**Figura 6.13.** Gel de agarosa; resultados de sexaje de 10 embriones bovinos producidos *in vitro*.

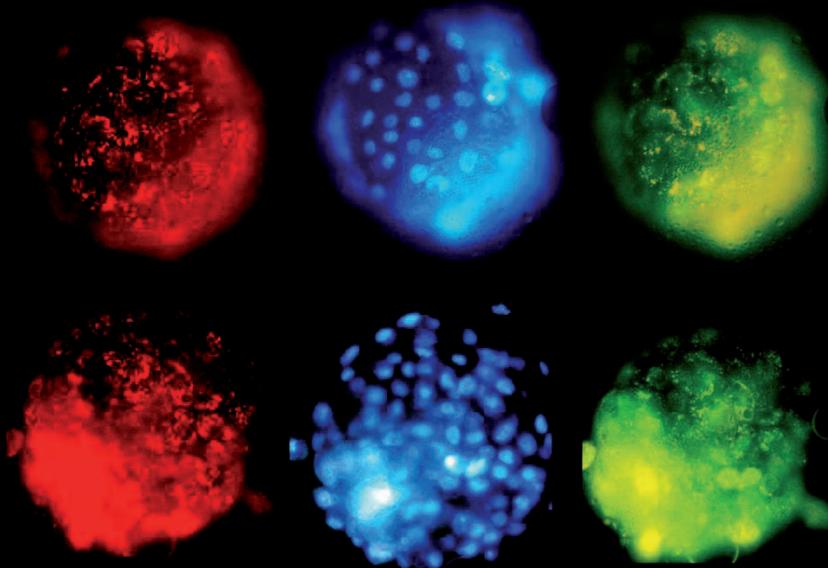


## Bibliografía recomendada

Nedambale TL, A Dinnyes, X Yang, XC Tian (2004) Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification, *Biol Reprod* 71, 1671-1676.

Kit DNeasy® Blood & Tissue. Quiagen. 25-27.





# Capítulo 7

## Tinciones utilizadas en oocitos y embriones bovinos

Autores: Ariel Marcel Tarazona Morales, Juan Camilo Álvarez Balvín, Juliana Victoria Bedoya Jaramillo, Zulma Tatiana Ruiz Cortés.

La evaluación de oocitos y embriones bovinos mediante técnicas de tinción tiene gran relevancia para determinar los efectos que pueden tener las diferentes sustancias o condiciones utilizadas en los procesos de producción de embriones bovinos *in vitro* sobre la funcionalidad celular en diferentes estadios. En este capítulo se describen los procedimientos a realizar en algunas de estas técnicas.

### Montaje de embriones para tinciones fluorescentes

- **Propósito:** Indicar la metodología para el montaje de embriones en portaobjetos, conservando su morfología esférica para la evaluación de diferentes parámetros.

- **Materiales:** Láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo (ver capítulo 2), mezcla parafina-vaselina.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).

Procedimiento:

*Para la realización de la mezcla parafina-vaselina:*

- Pesar 2 gr de parafina y 40 gr de vaselina (1:10 p/p) en un beaker de 100 ml.
- Calentar la mezcla hasta que los componentes se disuelvan completamente y se incorporen.
- Colocar la mezcla líquida en jeringas de 5 o 10 ml y mantenerlas en refrigeración (ver figura 7.1).

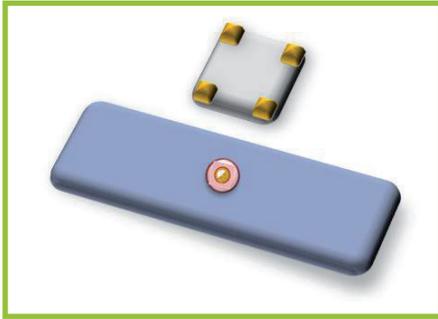


**Figura 7.1.** Jeringa con mezcla parafina-vaselina.

*Para el montaje de los embriones:*

- Marcar la lámina portaobjeto en uno de los extremos con marcador permanente, con la información del embrión que se desea evaluar.
- Preparar la laminilla cubreobjeto, colocando cuatro puntos de mezcla de parafina-vaselina en las cuatro esquinas para tener un espacio que evitará que el embrión pierda su forma y permitirá una mejor manipulación durante la observación bajo el microscopio de fluorescencia (ver figura 7.2).

*Nota:* Si se requiere un conteo de las células se debe ejercer una presión controlada sobre el cubreobjetos hasta que se rompa la zona pelúcida.



**Figura 7.2.** Preparación del montaje para evaluación de embriones.

- Poner una gota de 10  $\mu\text{l}$  de medio HEPES en la lámina portaobjeto, y en ella el embrión a evaluar. Poner encima la laminilla cubreobjeto previamente preparada y evaluar al microscopio.

*Nota:* En cada lámina portaobjeto se pueden evaluar hasta 10 embriones.

Para una mejor observación al microscopio, utilizar una punta o aguja para mover con pequeños toques el cubreobjeto, así el embrión puede girar para buscar el ángulo deseado de evaluación.

## Tinción de Hoechst para evaluación nuclear

- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo Hoechst.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES, Hoechst 33342 a 10 $\mu\text{g/ml}$  (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y adicionar 10  $\mu\text{l}$  de solución Hoechst de trabajo (10 mg/ml), luego incubarlos a 38,6  $^{\circ}\text{C}$  y 6%  $\text{CO}_2$  durante 5 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y el filtro azul.
- Los núcleos de las blastómeras emitirán fluorescencia azul y se verán redondos y ubicados al centro de la célula. Los resultados se expresan en número de núcleos (células) (ver figura 7.3).

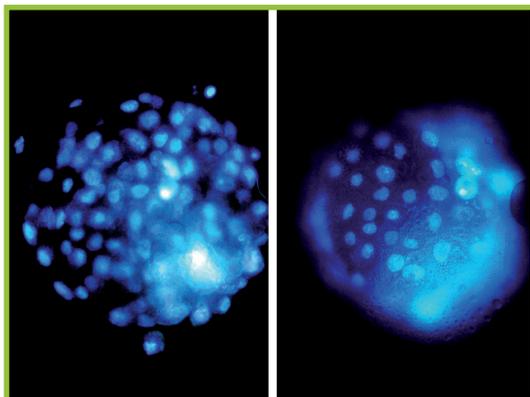


Figura 7.3. Embriones teñidos con Hoechst.

## Tinción con JC-1 potencial mitocondrial transmembranal

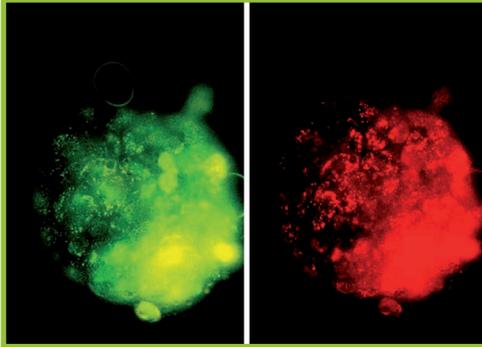
- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo JC-1.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución de tinción JC-1 a 7,5  $\mu\text{M}$  (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y 1  $\mu\text{M}$  de tinción cultivo JC-1 en el mismo medio, luego incubarlos a 38,6°C y 6%  $\text{CO}_2$  durante 25 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y los filtros para rodamina (BP 450-490, FT 510, LP 515) y fluoresceína (G 365, FT 395, LP 420).
- El control positivo se realiza con oocitos madurados *in vitro* incubados en medio de tinción (también se pueden usar células de granulosa); el control negativo se realiza incubando los embriones en medio de cultivo sin colorante.



- Las mitocondrias con alto potencial de membrana se observarán de color rojo (filtro 14) (ver figura 7.4 A) y las que tienen bajo potencial se observarán de color verde (filtro 09) (ver figura 7.4 B). Los resultados se expresan en porcentaje de coloración roja con respecto a los controles positivos.



**Figura 7.4.** A. Embrión con mitocondrias con alto potencial de membrana; B. Embrión con mitocondrias con bajo potencial de membrana.

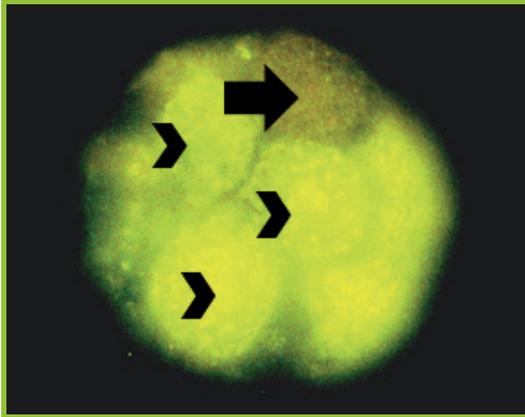
## Tinción con dihidro-rodamina (DHR) para evaluación de $H_2O_2$

- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo DHR.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de  $CO_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo (ver capítulo 2), Solución DHR a 1 $\mu$ M.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu$ l HEPES de trabajo y 1  $\mu$ M de DRH en el mismo medio, luego incubarlos a 38,6°C y 6%  $CO_2$  durante 15 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia utilizando el filtro 09 (fluoresceína) en objetivo de 40X.

- El control positivo se realiza incubando los embriones en el medio de tinción a una concentración final en gota de incubación de  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; el control negativo se realiza incubando los embriones en gota de medio de cultivo sin DHR. Las células positivas se observarán de color verde intenso fluorescente, lo cual corresponde a aquellas que presentan acumulación intracelular de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados se expresan en porcentaje de células positivas.



**Figura 7.5.** Embrión con la tinción DHR. Se señalan las células positivas con punta de flecha, y se señala la célula negativa con flecha.

## Tinción con AO/EB para evaluación de apoptosis

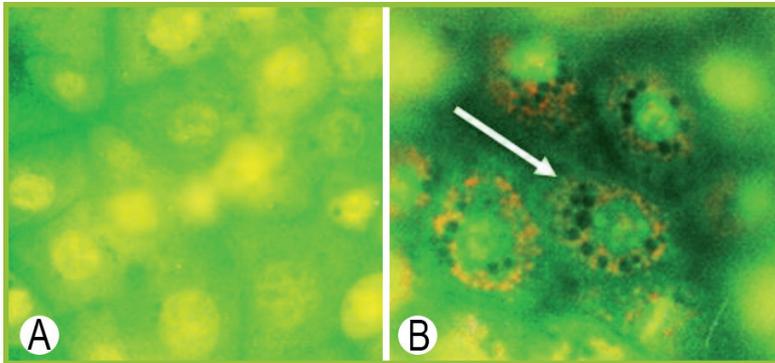
- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con los fluorocromos AC (Acridine Orange) y EB (Ethidium Bromide) AO/EB.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución AO/EB a  $5 \mu\text{M}$  (concentración final) (solución stock a 0,1 mg/ml) (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de  $50 \mu\text{l}$  HEPES de trabajo y  $5 \mu\text{M}$  de AO/EB en el mismo medio, luego incubarlos a  $38,6^\circ\text{C}$  y  $6\% \text{CO}_2$  durante 1 minuto.



- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia utilizando el objetivo de 40X.
- El control positivo se realiza incubando embriones en 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante toda la noche para inducir apoptosis; el control negativo se realiza usando embriones sincrónicos competentes de dos células. Para la lectura: las células normales (CN) presentan cromatina verde brillante, las células en apoptosis temprana (CAT) presentan cromatina altamente condensada o fragmentada verde brillante, las células en apoptosis tardía (CATA) presentan cromatina altamente condensada o fragmentada naranja brillante, y las células necróticas (CN) presentan cromatina naranja brillante (Leite et al, 1999) (ver figura 7.6). Los resultados se expresan en porcentaje de células apoptóticas, necróticas y viables.



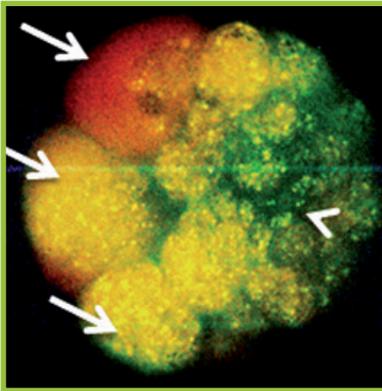
**Figura 7.6.** Tinción AO/EB. A. Embrión viable (células verde brillante); B. Embrión no viable (células naranja brillante). La flecha señala presencia de cuerpos apoptóticos.

## Evaluación de caspasas activas, tinción con Z-VAC-FMK

- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo Z-VAC-FMK, con el fin de evaluar caspasas activas.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución Z-VAC-FMK a 1  $\mu\text{M}$  (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En la cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y 1  $\mu\text{M}$  Z-VAC-FMK en el mismo medio, luego incubarlos a 38,6°C y 6%  $\text{CO}_2$  durante 20 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y el filtro para fluoresceína.
- La FITC-VAD-fluorometilcetona Z-VAC-FMK es un inhibidor permeable para caspasas de amplio espectro (Zakeri, et al, 2005), que exhibe fluorescencia verde brillante en presencia de las caspasas activas 3, 6 y 9. Las células con baja activa de caspasas presentan coloración verde opaca o roja (inactivas) (ver figura 7.7). Los resultados se expresan en porcentaje de células con coloración positiva del total de células evaluadas.



**Figura 7.7.** Coloración de caspasas. Se señalan las células con caspasas positivas con punta de flecha, y se señalan las células con caspasas negativas con flecha.

## Tinción con naranja de acridina para celularidad

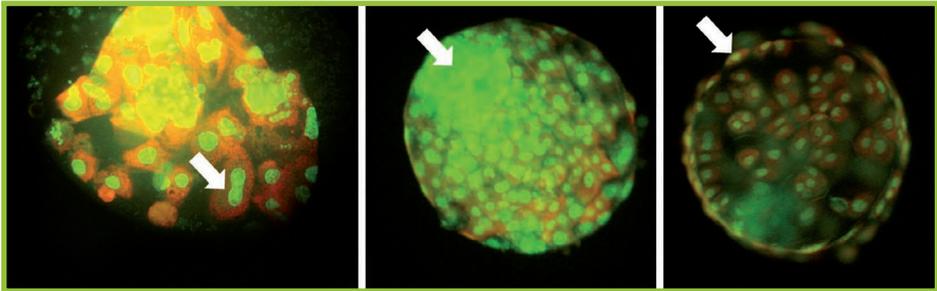
- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con los fluorocromos AC (Acridine Orange) y EB (Ethidium Bromide) AO/EB
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución de naranja de acridina de trabajo 5 $\mu\text{M}$  (concentración final) (solución stock a 0,1 mg/ml) (ver capítulo 2).



- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de flourocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo, pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y adicionar 10  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo de naranja de acridina (330  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), para una concentración final de 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , luego incubarlos a 38,6°C y 6% CO<sub>2</sub> durante 5 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y el filtro verde.
- Los núcleos de las blastómeras emitirán fluorescencia verde brillante y se verán redondos y ubicados al centro de la célula. Los resultados se expresan en número de núcleos (células) (ver figura 7.8).



**Figura 7.8.** Embriones teñidos con naranja de acridina. A. Se señalan los núcleos teñidos. B. Se señala la masa celular interna. C. Se señalan las células trofoectodermo.

## Técnica de túnel para la detección de apoptosis en embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar la técnica de marcaje *in situ* del ADN fragmentado en blastómeras de embriones bovinos.
- **Materiales:** Cajas de Petri de 60 mm, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , nevera de poliestireno expandido (icopor), con hielo, recipiente oscuro, tubos de microcentrífuga de 0,5 ml, portaobjetos y cubreobjetos limpios, servilletas y tijeras.
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia y platina térmica.

- **Medios:** Solución PBS + 0,025% PVP, paraformaldehído 4%, tritón X-100 al 0,5% (v/v) + citrato de sodio al 0,1% (w/v), buffer de equilibrio, enzima rTdT (deoxinucleotidil transferasa recombinante), Mix dUTPs (deoxinucleótidos conjugados con fluoresceína), SSC 2X, aceite mineral, Hoechst (10 µg/ml) (ver capítulo 2), solución antifade.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

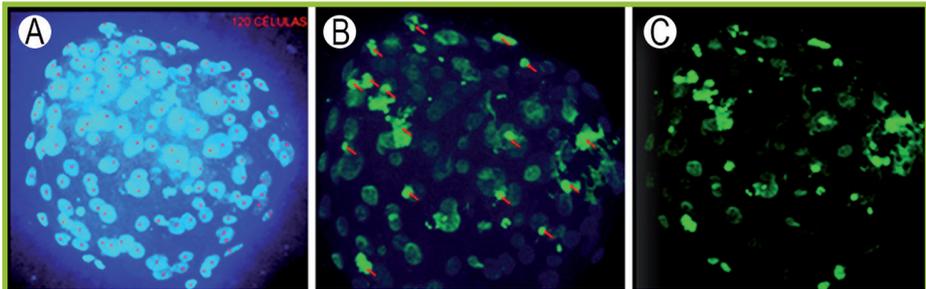
- Sacar los embriones del medio de cultivo y realizar un doble lavado en gotas de 50 µl de PBS + 0,025% PVP (1 minuto por cada gota).
- Fijar los embriones en una gota de 50 µl de paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4°C. Repetir el paso 1.
- Después de la fijación de los embriones, estos pueden ser guardados en el medio de lavado a 4°C por un período de tres semanas. En caso contrario, continuar con el proceso.
- Someter los embriones a un proceso de permeabilización, ponerlos en una solución de tritón X-100 al 0,5% (v/v) + citrato de sodio al 0,1% (w/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Repetir el paso 1.
- Poner los embriones en una gota de 50 µl de solución buffer de equilibrio (Be) por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir los embriones a una gota de 50 µl del mix de reacción, cubrir con aceite mineral e incubar a 37°C por 1 hora en condiciones de completa oscuridad.
- Sacar los embriones de la solución de incubación y transferirlos a una gota de 50 µl de SSC 2X por 15 minutos a temperatura ambiente. Repetir el paso 1.
- Poner los embriones en un portaobjetos y adicionar 10 µl de Hoechst ([w] = 10 µg/ml) por 1 minuto, retirar el exceso de Hoechst y lavar con PBS + 0,025% PVP, retirar el exceso de medio de lavado, adicionar 10 µl de solución antifade y colocar el cubreobjetos (ver figura 7.2).
- Observar en microscopio de epifluorescencia teniendo en cuenta las longitudes para la fluoresceína (520 ± 20 nm) y el Hoechst (emisión a 352 nm y excitación a 455 nm). Realizar registro fotográfico con cada filtro para su posterior conteo (ver figura 7.9).
- El control positivo se realiza efectuando los pasos 1, 2, 3 y 4 del protocolo de túnel. Posteriormente, incubar los embriones en una solución de DNasa tipo I (50 U/ml) a 37°C por 1 hora en condiciones de completa oscuridad. Llevar los embriones a una gota de medio de lavado y continuar con el paso 5 (ver figura 7.10 A). El control



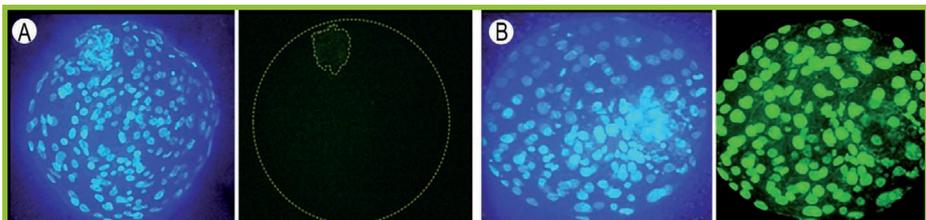
negativo se realiza siguiendo los pasos del protocolo de túnel, pero omitiendo la adición de la enzima rTdT durante la preparación del mix de reacción (ver figura 7.10 B).

## Doble tinción con Hoechst/Ioduro de Propidio para la viabilidad embrionaria

- **Propósito:** Indicar la técnica de doble tinción con Hoechst 33342 e ioduro de propidio para realizar un conteo diferencial de células viables y células muertas.
- **Materiales:** Cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, portaobjetos y cubreobjetos limpios, servilletas y tijeras.
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia y platina térmica.
- **Medios:** PBS + 0,025% PVP, Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/ml), ioduro de propidio (0,05 mg/ml), solución antifade (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).



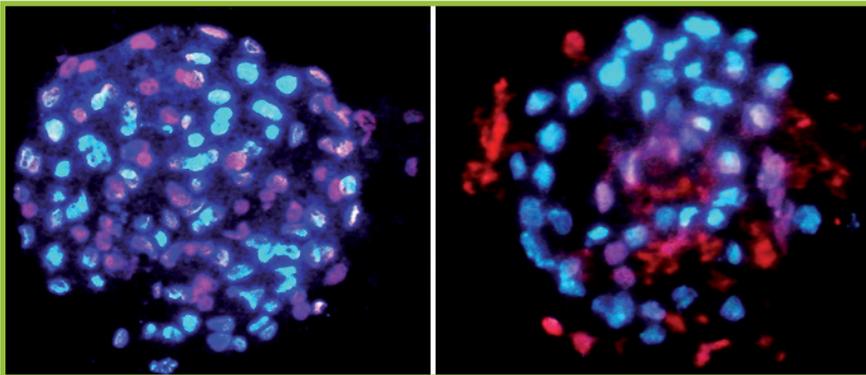
**Figura 7.9.** Tinción técnica TUNEL A. Presenta el conteo celular basado en una tinción de contraste con Hoechst; B. Corresponde a una fusión del registro fotográfico captado con dos filtros diferentes, empleada para verificar las células positivas para TUNEL; C. Muestra los puntos en el embrión donde se evidencia la incorporación de nucleótidos con jugados con fluoresceína (verde fluorescente). El índice de apoptosis se obtiene dividiendo la cantidad de células positivas para TUNEL sobre el total células del embrión.



**Figura 7.10.** A. Control negativo de la técnica de TUNEL (bloqueo de la incorporación de nucleótidos mediante la omisión de la enzima rTdT durante la incubación con el mix de reacción). B. Control positivo de la técnica de TUNEL (fragmentación general en las blastómeras inducido por la acción de una DNasa tipo I).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones del medio de cultivo y realizar un doble lavado en gotas de PBS + 0,025% PVP (1 minuto por cada gota).
- Tomar un embrión con un volumen de 10  $\mu$ l de medio de lavado y ubicarlo en el portaobjetos previamente marcado. Retirar el exceso de medio y adicionar 10  $\mu$ l de solución Hoechst (10  $\mu$ g/ml) por un minuto. Mantener la muestra alejada de la luz directa.
- Retirar el Hoechst y adicionar 10  $\mu$ l de solución PBS + 0,025% PVP, realizar un pipeteo suave sin perder de vista el embrión. Retirar el medio de lavado.
- Adicionar 10  $\mu$ l de yoduro de propidio (0,05 mg/ml) por un minuto. Tener en cuenta las recomendaciones del paso 2.
- Retirar el exceso de yoduro de propidio y proceder al lavado indicado en el paso 3. adicionar 10  $\mu$ l de solución antifade y colocar el cubreobjetos (ver figura 7.2).
- Observar en microscopio de epifluorescencia empleando un filtro en capacidad de leer la intensidad de ambos fluorocromos: Hoechst (emisión a 352 nm y excitación a 455 nm) y el yoduro de propidio (emisión a 338 nm y excitación a 617 nm).



**Figura 7.11.** Ambos fluorocromos se intercalan en el ADN. El Hoechst ingresa a todas las células, pero el yoduro de propidio sólo entra en las células muertas o necróticas (con daño en membrana).



## Bibliografía recomendada

- Leite M, Quinta CM, Leite PS, Guimarães JE (1999), Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60, *Anal. Cell Pathol*, 19(3-4): 139-151.
- Zakeri Z, Lockshin RA, Criado-Rodríguez LM, Martínez AC (2005) A generalized caspase inhibitor disrupts early mammalian development, *Int. J. Dev. Biol*, 49: 43-47.





# Capítulo 8

## Procedimientos para la criopreservación de células reproductivas y embriones bovinos

**Autores:** Natalia Andrea Gómez Morales,  
Juliana Victoria Bedoya Jaramillo, Felipe Penagos Tabares,  
Ángela Patricia López Cardona, Yasser Yohan Lenis Sanín  
y David Andrey Cadavid Betancur

La conservación de recursos genéticos mediante congelación a bajas temperaturas es una opción para maximizar el potencial reproductivo de animales de interés. Para ello se han desarrollado diferentes técnicas con resultados variables. Una de ellas es la vitrificación, para la cual existen diferentes procedimientos de acuerdo a la experiencia de cada laboratorio. A continuación se describen los procedimientos de criopreservación utilizados en el laboratorio para conservar células reproductivas y embriones bovinos.

## Vitrificación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la vitrificación de embriones bovinos.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, OPS (Open Pulled Straw), go-belets, escalerilla, cinta, cajas de Petri de 100 mm, y puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, cronómetro, termo con nitrógeno líquido.
- **Medios:** Medio de mantenimiento (MM), medio (SV1), medio (SV2), nitrógeno líquido (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y gafas para manipulación de nitrógeno (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Seleccionar los embriones que se encuentren en estadios transferibles: mórula compacta (Mo), blastocisto temprano (Bt), blastocisto (BL) y blastocisto expandido (BX) (ver figura 8.1), todos grado 1 (ver tabla 5.4).
- En una caja de Petri de 100 mm, servir 5 gotas de 50  $\mu$ l de medio MM, SV1 y SV2 respectivamente, y microgotas de 2  $\mu$ l de SV2 (ver figura 8.2).



Figura 8.1. Estadios transferibles aptos para vitrificación

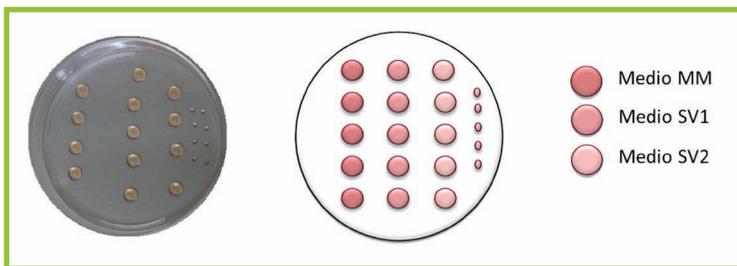


Figura 8.2. Diagrama de preparación de cajas de vitrificación.



*Nota:* Los medios deben estar previamente atemperados a 37°C, las gotas se deben utilizar una sola vez.

- Marcar las OPS con la cantidad y el estadio de los embriones a cargar en cada una, evitando al máximo tocar las puntas (ver figura 8.3).
- Pasar de 2 a 3 embriones seleccionados por vez al medio MM, luego pasar los embriones a medio SV1 durante 1 minuto y después, con la menor cantidad de medio SV1 posible, ponerlos en medio SV2 durante 20-25 segundos. Cargar los embriones en la OPS después de depositarlos en las microgotas (ver figura 8.4 A).
- Introducir la OPS cargada directamente y en el menor tiempo posible en nitrógeno líquido (ver figura 8.4 B).
- Almacenar la OPS en un gobelet y taparlo con la mitad de otro, disponer este en una escalerilla debidamente marcada (ver figuras 8.4 C y D).

## Devitrificación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la devitrificación de embriones bovinos y su posterior cultivo.

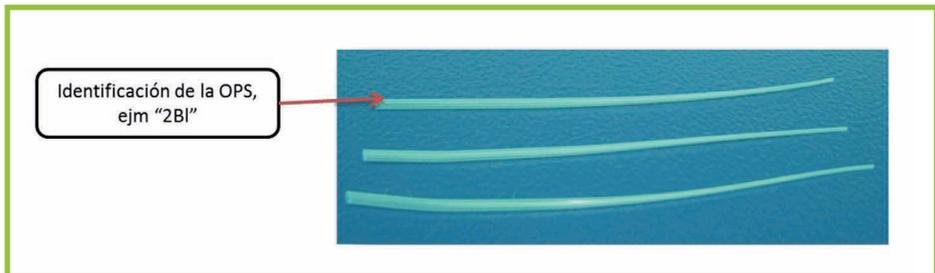


Figura 8.3. OPS (Open Pull Straw)

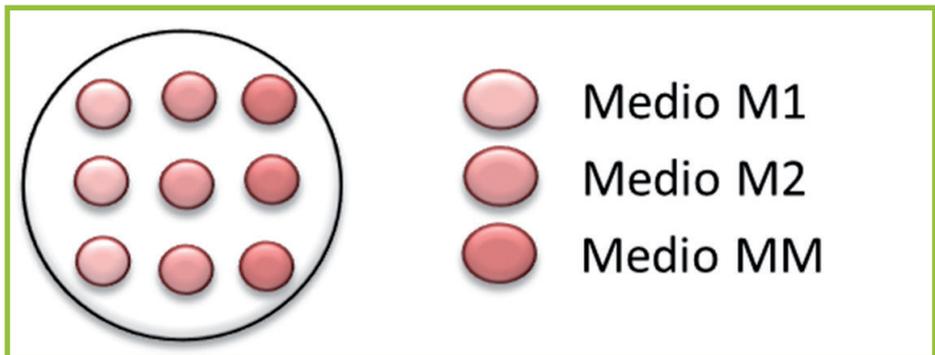


Figura 8.4 A. Empaque de embrión en OPS; B. OPS sumergida en nitrógeno; C. Empaque de OPS en escalerilla; D. Forma de almacenamiento.

- **Materiales:** Cajas de Petri de 60 mm y puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, cronómetro y tijeras.
- **Medios:** Medios de devitrificación (M1, M2 y MM) (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y gafas para manipulación de nitrógeno (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- En una caja de Petri de 60 mm, servir 3 gotas de 50  $\mu$ l de medio M1, M2 y MM respectivamente, previamente atemperados a 37°C (ver figura 8.5).

*Nota:* Cada gota se debe usar una sola vez.

- Sacar las OPS del termo de nitrógeno líquido y dejarla al aire 5 segundos.
- Poner la punta de la OPS en una gota de 50  $\mu$ l de M1 para que descongele, asegurarse de que salga todo el contenido de la OPS.
- Pasar inmediatamente los embriones a otra gota de 50  $\mu$ l M1 con la menor cantidad de medio de la gota anterior y dejar los embriones allí durante 5 minutos. Poner los embriones en una gota de 50  $\mu$ l de M2 durante 5 minutos más y finalmente ponerlos en una gota de MM.
- Realizar mínimo 3 lavados con medio de cultivo CR1 AA (ver capítulo 2), y cultivar los embriones bajo las mismas condiciones que se especifican en el capítulo 5.

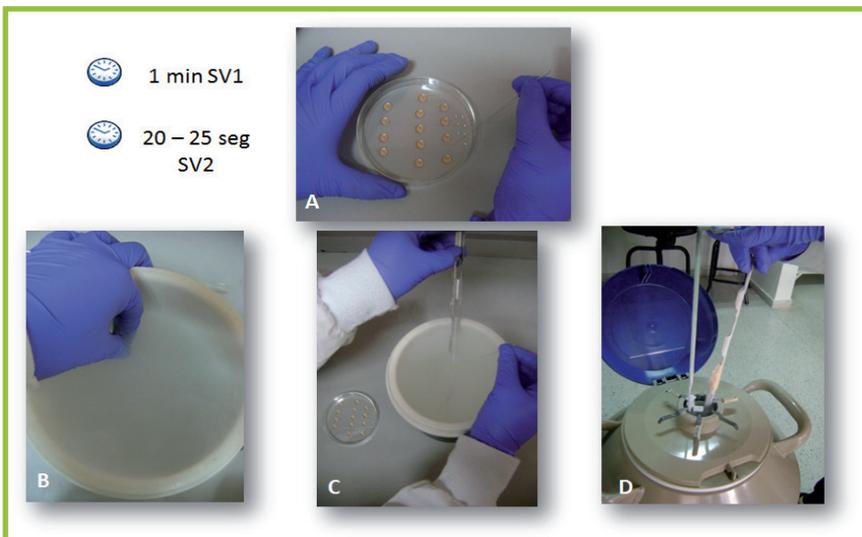


Figura 8.5. Diagrama de preparación de cajas de devitrificación.



## Congelación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la congelación de embriones bovinos.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, pajillas, lacradores, cajas de Petri de 100 mm, gobelets, escalerilla, pinza metálica o isopo, puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, emparador de pajillas o jeringa de insulina, cronómetro, congeladora, termo con nitrógeno líquido.
- **Medios:** Medio MM, medio de congelación (MC), nitrógeno líquido (ver capítulo 2),
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y gafas para manipulación de nitrógeno (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- En una caja de Petri de 100 mm, servir 10 gotas de 50  $\mu$ l de medio MM y 5 gotas del mismo volumen de medio MC.

*Nota:* Cada gota se debe usar una sola vez.

- Seleccionar los embriones en estadios transferibles: mórula (Mo), blastocisto temprano (Bt), blastocisto (BL) y blastocisto expandido (BX) (ver figura 8.1), grado 1 (ver tabla 5.4.) y pasarlos por las 10 gotas de MM.
- Marcar los lacradores con la cantidad y el estadio de los embriones a cargar en cada una (ver figura 8.6 B).
- Poner los embriones en el medio MC y cargar en las pajillas uno a uno o en grupo de acuerdo a la necesidad (ver figura 8.6 A y 8.6 C).
- Someter la pajilla a vapores de nitrógeno por 2 segundos (ver figura 8.7 A).
- Introducir las pajillas en la congeladora a  $-6^{\circ}\text{C}$  e inducir la congelación de la pajilla con un pinza o isopo poniendo en contacto este con el nitrógeno líquido y luego

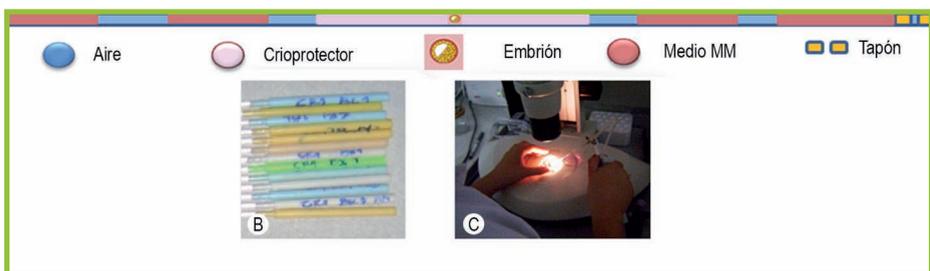
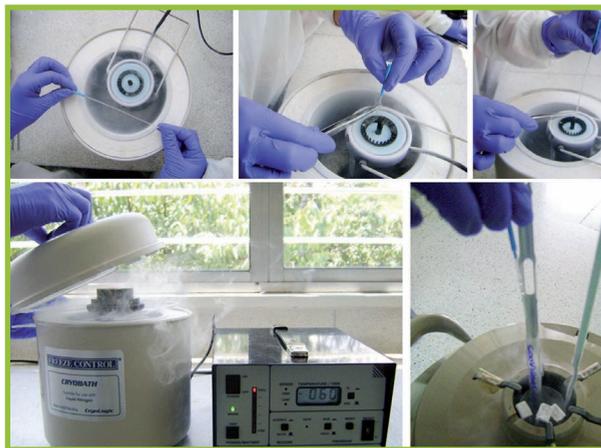


Figura 8.6 A. Diagrama de empaque de embriones; B. Lacradores marcados; C. Empaque de embriones

poniéndolo directamente sobre las columnas adyacentes a la columna que contiene el embrión con el fin de generar una cristalización homogénea (ver figuras 8.7 B y C).

- Comenzar con el descenso de temperatura a  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  hasta  $-35^{\circ}\text{C}$  (ver figura 8.7 D).
- Introducir inmediatamente las pajillas directamente en el termo con nitrógeno líquido (ver figura 8.7 E).



**Figura 8.7 A.** Vapores de nitrógeno; B. Seeding de la parte superior de la pajilla; C. Seeding de la parte inferior de la pajilla; D. Congeladora en funcionamiento; E. almacenamiento de embriones congelados.

*Nota:* El proceso de la selección de los embriones y la introducción en la congeladora no debe superar los 10 min.

## Descongelación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la descongelación de embriones bovinos, ya sea para su cultivo o para transferencia directa.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 60 mm, puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cronómetro, termo de nitrógeno líquido.
- **Medios y reactivos:** Medio de mantenimiento MM (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1) y gafas para manipulación de nitrógeno.



Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- En una caja de Petri de 60 mm, servir 6 gotas de 50  $\mu$ l de medio MM y 3 gotas de 50  $\mu$ l de medio CR1 AA, previamente atemperados a 37°C (ver figura 8.8).

*Nota:* Cada gota se debe usar una sola vez.

- Retirar la pajilla del termo de nitrógeno y dejarla 5 segundos al aire; luego, sumergirla en agua a 32°C por 30 segundos.

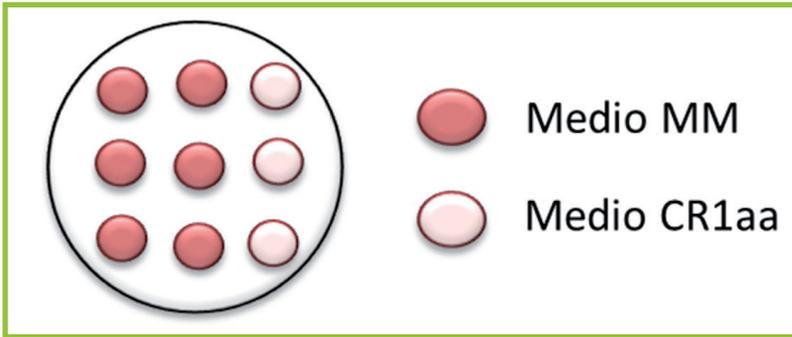


Figura 8.8. Diagrama de preparación de cajas de descongelación.

- Vaciar la pajilla en caja de Petri y poner los embriones en la primera gota de MM por 1 minuto, luego pasarlos a una segunda gota de MM por otro minuto. Finalmente, realizar mínimo 3 lavados con medio de cultivo CR1 AA (ver capítulo 2) y cultivar los embriones bajo las mismas condiciones que se especifican en el capítulo 5.

*Nota:* para transferencia directa se retira la pajilla del termo de nitrógeno, se deja 5 segundos al aire y se sumerge en agua a 32°C por 30 segundos; se debe transferir dentro de los primeros 15 minutos.

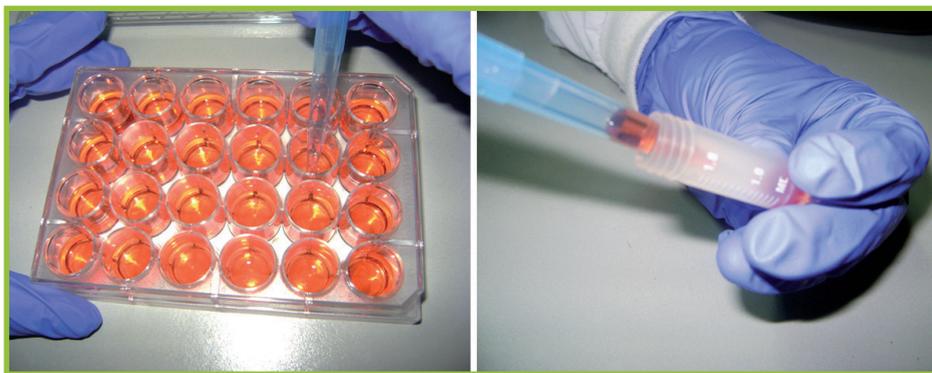
## Lavado de CEEP precongelamiento

- **Propósito:** Describir el procedimiento de eliminación de residuos del medio de cultivo y detritos celulares antes de la criopreservación.
- **Materiales:** Puntas de 1000  $\mu$ l, tubos de microcentrífuga, crioviales de 1 ml.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipeta de 1000  $\mu$ l, centrífuga.

Procedimiento:

- Extraer de la incubadora la caja de 24 pozos que contiene las células y llevar a la cabina de flujo.

- Desprender las células adheridas al fondo de los pozos con una punta de 1000  $\mu\text{l}$  estéril (acción mecánica) Realizar este procedimiento asegurándose de haber cubierto la totalidad del pozo (ver figura 8.9 A).



**Figura 8.9.** Lavado de CEEP precongelamiento. A. Desprendimiento de las células del pozo; B. Almacenamiento de las células en el criovial.

- Depositar la suspensión celular de los pozos en un vial de 1 ml previamente marcado con el biotipo celular, la fecha, la hora de congelación y el nombre del responsable; asegurar una concentración total de 1.200.000 células/ml.
- Centrifugar los crioviales a 2000 RPM por 2 minutos hasta conseguir la formación del pellet celular en el fondo.
- Extraer el sobrenadante (medio de cultivo) dejando únicamente el contenido celular; luego reemplazar el medio de cultivo por el medio crioprotector (ver figura 8.9 B).

## Congelación de CEEP

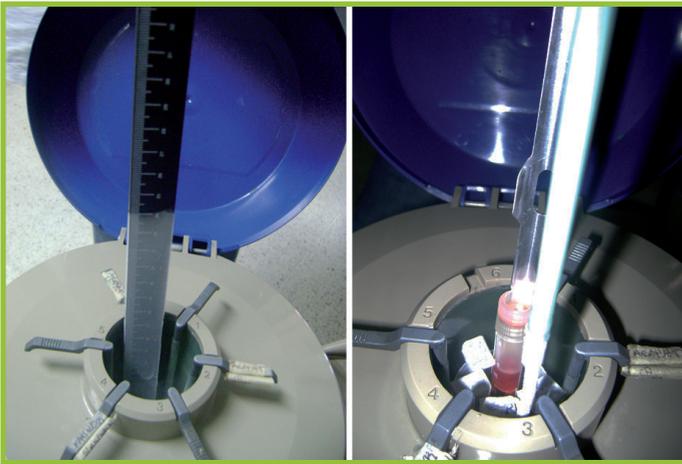
- **Propósito:** Indicar el procedimiento adecuado para la congelación de CEEP.
- **Materiales:** Crioviales de 1 ml, nevera de poliestireno expandido, hielo, nitrógeno líquido, gasas estériles, puntas para micropipeta 1000  $\mu\text{l}$  estériles.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipetas de 1000  $\mu\text{l}$ , microcentrífuga, nevera de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , termo de nitrógeno líquido.
- **Medios y reactivos:** Etilenglicol probado para células, RPMI.

### Procedimiento:

- Preparar una nevera de poliestireno expandido con hielo (temperatura aproximada  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y depositar el criovial en la nevera durante 1 hora.



- Someter los crioviales a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas; asegurarse de que el cambio de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  se realice de forma rápida.
- Someter los crioviales a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 3 horas; asegurarse de que el cambio de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  se realice de forma rápida (ver figura 8.10 A).
- Introducir los crioviales en una canastilla vacía del termo de nitrógeno líquido.
- Sellar, introduciendo a la canastilla una gasa estéril para evitar que los tubos floten.
- Evaluar periódicamente los niveles de nitrógeno líquido para asegurar la viabilidad de las células congeladas (ver figura 8.10 B).



**Figura 8.10.** Congelación de CEEP. A. Almacenamiento del criovial en nitrógeno líquido; B. Medición del nivel de nitrógeno líquido.

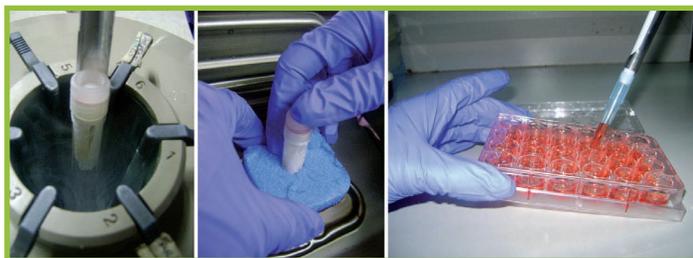
## Descongelación y cultivo de CEEP

- **Propósito:** Describir el procedimiento de descongelación, lavado y cultivo de CEEP.
- **Materiales:** Puntas de  $1000\ \mu\text{l}$ , tubos de microcentrífuga, cajas Petri.
- **Equipos:** Baño serológico, cabina de flujo laminar, micropipeta de  $1000\ \mu\text{l}$ , centrífuga, microscopio, cámara de Neubauer.
- **Medios:** RPMI suplementado (ver capítulo 2).

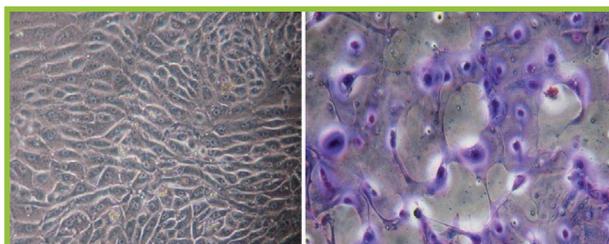
Procedimiento:

- Extraer del termo de nitrógeno líquido los crioviales que serán destinados a descongelación (ver figura 8.11 A).

- Introducir por un minuto los crioviales al baño serológico, graduado previamente a una temperatura de 30°C (ver figura 8.11 B).
- Centrifugar los crioviales a 2000 RPM por 2 minutos hasta conseguir la formación del pellet celular en el fondo.
- Extraer el medio crioprotector y remplazar con 1 ml de RPMI suplementado, teniendo en cuenta que el medio de lavado esté temperado a 30°C.
- Centrifugar de nuevo los crioviales a 2000 RPM por 2 minutos hasta conseguir la formación del pellet celular en el fondo del criovial.
- Extraer el medio de lavado y remplazarlo con 1 ml de RPMI suplementado. El medio de cultivo debe estar precalentado a 30°C.
- Homogenizar las células, realizar el conteo en cámara de Neubauer y sembrar en una caja de pozos a la concentración deseada (ver figura 8.11 C).
- Llevar la caja a la incubadora a condiciones controladas (37,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% de humedad relativa).
- Realizar cambio de medio cada 48 horas (ver capítulo 3).
- Evaluar el cultivo periódicamente como en el cultivo inicial. (ver figura 8.12)



**Figura 8.11.** Descongelamiento de CEEP. A. Extracción del criovial del termo de nitrógeno; B. Criovial en el baño serológico; C. Cambio de medio de cultivo.



**Figura 8.12.** Morfología de CEEP sometidas a la criopreservación. A. Se observan CEEP de 8 días posdescongelación; estas presentan una confluencia de 90% aproximadamente; B. Se observan CEEP con 4 días posdescongelación teñidas con hematoxilina-eosina.



## Bibliografía recomendada

- Freshney, R. I. (1994), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª ed., Nueva York: Wiley-Liss, pp. 254-263.
- Hay, R. J. (1978), *Preservation of Cell Culture Stocks in Liquid Nitrogen*, TCA Manual 4, pp. 787-790.
- Lenis Y., Olivera M., Duque M., Tarazona A. (2009), Criopreservación de células epiteliales endometriales bovinas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, Medellín, Vol. 62, fasc. 3: 64.
- Schroy, C. B.; Todd, P. (1976), *A Simple Method for Freezing and Thawing Cultured Cells*, TCA Manual 2, Procedure Number 76035, pp. 309-310.
- Shannon, J. E.; Macy, M. L. (1973), Freezing, Storage, and Recovery of Cell Stocks, en: P. F. Kruse y M. K. Patterson Jr (eds.), *Tissue Culture: Methods and Applications*, Nueva York: Academic Press, pp. 712-718.



Desde 1995, el grupo de investigación Biogénesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia ha estado dedicado a la investigación en biotecnología de la reproducción, y una de las principales dificultades para llevar a cabo el trabajo de laboratorio ha sido la falta de protocolos para la rutina del cultivo de tejidos reproductivos y para la producción y manipulación de los embriones, incluyendo las buenas prácticas en estos procesos. El presente libro recoge la experiencia de nuestro grupo y se presenta como un aporte para estimular la investigación y el servicio en este campo biotecnológico.



Autores y editores académicos