

**Comparación de los protocolos SOF y TALP
de Fertilización in vitro en bovinos en el
Laboratorio de Reproducción Animal de
Zamorano**

**Luis Felipe Caicedo Montoya
Mateo Toro Sánchez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Comparación de los protocolos SOF y TALP de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Luis Felipe Caicedo Montoya
Mateo Toro Sánchez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Comparación de los protocolos SOF y TALP de Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano

Luis Felipe Caicedo Montoya
Mateo Toro Sánchez

Resumen. La fertilización *in vitro* es una biotecnología que mejora la eficiencia productiva y acelera la mejora genética de las explotaciones ganaderas. Para obtener rendimientos rentables por medio de esta técnica es necesario implementar protocolos que maximicen el número de embriones producidos, es por esto que el objetivo de este estudio fue comparar la eficiencia en la producción de embriones *in vitro* de los protocolos Fluido Sintético del Oviducto (SOF) y Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALP). El experimento se hizo en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Para el desarrollo del estudio se aspiraron ovarios de vacas *post mortem* de matadero por medio de la técnica de punción folicular. Para el protocolo SOF se extrajeron 262 oocitos, de los cuales 161 oocitos fueron viables (3.5 oocitos viables/ovario); de los 161 oocitos viables se maduraron 92 (57.1%) presentando una expansión de las células del *cumulus oophorus*; de los 92 oocitos madurados 9 (9.8%) fueron fertilizados; de los 9 oocitos fertilizados 2 (22.2%) presentaron división celular (clivaje) y 7 (77.8%) estuvieron en muerte celular (apoptosis); obteniendo 2 (100%) blastocistos al séptimo día. Para el protocolo TALP se extrajeron 60 oocitos, de los cuales 39 oocitos fueron viables (2.8 oocitos viables/ovario); de los 39 oocitos viables se maduraron 36 (92.3%); de los 36 oocitos madurados 21 (58.3%) fueron fertilizados; de los 21 oocitos fertilizados 10 (47.6%) presentaron clivaje y 11 (52.4%) presentaron apoptosis; obteniendo 7 (70%) blastocistos al séptimo día. Se determinó la eficiencia final en base a la cantidad de blastocistos obtenidos/cantidad de oocitos viables, obteniendo una eficiencia de 17.95 y 1.24% para los protocolos TALP y SOF, respectivamente.

Palabras clave: Apoptosis, blastocisto, clivaje, *cumulus oophorus*, oocito.

Abstract. *In vitro* fertilization (IVF) is a biotechnology that increases productive efficiency and genetic improvement in livestock production. To obtain profitable results, however, the implementation of a valid protocol is required to maximize the amount of obtained embryos; thus, the objective of this study is to compare the efficiency, as of embryo production, of the protocols Synthetic Oviduct Fluid (SOF) and Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP). The study took place in the Animal Reproduction Laboratory of Zamorano University, Honduras. Embryos were obtained from several cows *post mortem* through follicular puncture. For the protocol SOF, 262 oocytes were extracted, obtaining 161 viable oocytes (3.5 viable oocytes per ovary); out of the 161, 92 matured (57.1%) showing expansion in the *cumulus oophorus*; out of those 92 matured oocytes, 9 (9.8%) were successfully fertilized. Of the 9 fertilized oocytes, 2 (22.2%) showed cleavage and 7 (77.8%) reached apoptosis; obtaining a total of 2 (100%) blastocysts after 7 days. As for the TALP protocol 60 oocytes were extracted, out of which 39 were proven as viable (2.8 viable oocytes per ovary); out of the 39 viable oocytes, 36 (92.3%) matured; 21 (58.3%) of the matured oocytes were fertilized. Out of the 21 fertilized oocytes, 10 (47.6%) showed cleavage while 11 (52.4%) underwent apoptosis; obtaining a total of 7 (70%) blastocysts after 7 days. The final efficiency of each protocol was determined as the ratio between

obtain blastocysts/viable oocytes, reaching an efficiency of 17.95% for TALP and 1.24% for SOF.

Key words: Apoptosis, blastocyst, cleavage, *cumulus oophorus*, oocyte.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iv
Contenido	v
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4. CONCLUSIONES.....	20
5. RECOMENDACIONES.....	21
6. LITERATURA CITADA.....	22
7. ANEXOS	24

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Oocitos aspirados viables y degenerados	14
2. Porcentaje de maduración <i>in vitro</i> para los protocolos SOF y TALP a las 24 horas.	15
3. Porcentaje de fertilización <i>in vitro</i> para los protocolos SOF y TALP a las 18 horas	16
4. Porcentaje de clivaje y apoptosis para los protocolos SOF y TALP.	17
5. Porcentaje de embriones obtenidos a los siete días de cultivo con los protocolos SOF y TALP.	19
6. Eficiencia de los protocolos SOF y TALP durante el proceso de fertilización <i>in vitro</i>	19
Figuras	Página
1. Oocitos recolectados.....	13
2. Oocitos con 24 horas en medio de maduración.....	14
3. Oocitos con 18 horas en medio de fertilización	16
4. Oocitos luego del cuarto día de fertilizado.....	17
5. Izquierda: A y B mórulas obtenidas al cuarto día de cultivo; Derecha: C blastocisto temprano día 7... ..	18
Anexos	Página
1. Preparación de las soluciones stock para el protocolo SOF	24
2. Preparación de los medios para el protocolo SOF.....	27
3. Preparación de las soluciones stock para el protocolo Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALP).....	31
4. Preparación de los medios para el protocolo TALP	34

1. INTRODUCCIÓN

La última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante, en lo que se refiere al desarrollo de tecnologías directas para la reproducción asistida en humanos y para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. Así mismo, en los actuales momentos se vive la era de la clonación y la transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas. La biotecnología ha experimentado un gran auge en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: los mamíferos. El desarrollo de nuevas biotecnologías para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de Fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones (Fernández et al. 2007).

La FIV es una biotecnología reproductiva que tiene un gran potencial como herramienta en el mejoramiento genético porque permite un acortamiento del intervalo generacional y logra aumentar la propagación del material genético en los hatos. Además, se han venido utilizando a los embriones bovinos como modelos para la investigación de procesos metabólicos, genéticos y del desarrollo de embriones de otras especies, incluso la especie humana. Este potencial ha favorecido el uso masivo y comercial de la técnica durante la última década. El número de embriones bovinos producidos *in vitro* y transferidos alrededor del mundo, pasó de 42,000 anuales, a casi 300,000 en los últimos 10 años, siendo Brasil el país con la mayor producción a nivel mundial. FIV es una biotecnología utilizada alternativamente para acelerar la producción de animales genéticamente superiores y para impedir, por medio de la aspiración *in vivo* de folículos, el descarte precoz de hembras genéticamente privilegiadas portadoras de alteraciones adquiridas (no transmisibles genéticamente a su descendencia) que impidan que la reproducción ocurra de forma natural (Gonella Diaza et al. 2013).

La FIV involucra un orden cronológico de etapas, las cuales se deben seguir rigurosamente para garantizar el éxito, y producir así la mayor cantidad de embriones maduros y fértiles. La FIV involucra las etapas de colecta de oocitos, maduración de los oocitos recolectados, fertilización de los oocitos (madurados), y el cultivo de embriones. La colecta de oocitos es la única etapa que se hace, por lo regular, fuera del laboratorio. La colecta se les hace a las hembras directamente en el lugar donde habitan, impidiendo la movilización de los animales y evitando trastornos reproductivos por causa de estrés.

La FIV es una biotecnología que aporta grandes ventajas a la sociedad, y de igual modo tiene ciertas desventajas que es importante mencionar. Entre las principales ventajas cabe recalcar: La evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos,

la difusión del uso de semen valioso y escaso, permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por erradicación de enfermedades y la prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos (Peláez 2011). Eleva el rendimiento de producción de embriones en hembras de alto valor genético, se pueden obtener oocitos de novillas a una edad de 6 meses, en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las dos a tres semanas de posparto (García Recilla y Martínez Quintero 2013). Las principales desventajas son: Bajo rendimiento, el porcentaje de oocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%, y los embriones producidos *in vitro* son de menor calidad que los obtenidos *in vivo* (Peláez 2011).

La FIV como una biotecnología en busca de mejora continua tiene el propósito de aumentar las tasas de embriones producidos *in vitro* y se ha buscado la optimización de los medios de cultivo, lo que ha conducido a la simplificación de los mismos, al eliminar los componentes innecesarios o incluso perjudiciales. Los resultados obtenidos han sido evaluados de acuerdo a complejos estudios metabólicos y moleculares. Los medios de cultivo están formulados en base a la presencia de iones, azúcares y aminoácidos (aa) en el ambiente uterino y oviductal, en el momento de la liberación del oocito, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Mejía Isaza et al. 2009).

Con base en lo anterior se desarrolló una investigación que tuvo como objetivo general evaluar y comparar el efecto de los protocolos Fluido Sintético del Oviducto (SOF por sus siglas en inglés) y Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALP por sus siglas en inglés) sobre la producción de embriones bovinos *in vitro*; y como objetivos específicos determinar el porcentaje de maduración *in vitro* (por expansión del *cumulus oophorus*), determinar el porcentaje de fecundación (por expulsión del segundo corpúsculo polar), determinar el porcentaje de clivaje y apoptosis y determinar el porcentaje de blastocistos obtenidos a los siete días de cultivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo de mayo a septiembre de 2016 en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. Los ovarios se obtuvieron de hembras faenadas en la planta de cosecha de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA) ubicada en el Valle del Yegüare a 6 km de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Una vez sacrificada la hembra se le extrajeron los ovarios y se mantuvieron en la solución de transporte a 38 °C.

Nota: Los procedimientos realizados en el día -1 para los protocolos SOF y TALP son iguales; en lo único que difieren son los medios de colección y maduración de oocitos que se utilizan en cada protocolo.

Descripción del protocolo con Fluidos Sintéticos de Oviducto (SOF):

En el Anexo 1 se presentan las formulaciones para la preparación de las soluciones stock para los medios SOF.

En el Anexo 2 se presentan los pasos para la preparación de los medios del protocolo SOF.

Procedimiento:

Día 1. Recuperación y lavado de ovarios, y colección y maduración de oocitos.

Recuperación de ovarios:

1. Se removieron los ovarios del tracto reproductivo de las vacas inmediatamente después de que los órganos fueron extraídos de la canal del animal y se colocaron en contenedores con solución salina atemperada a 38 °C.
2. Después que todos los ovarios fueron colectados, se removió el exceso de sangre de los ovarios realizando un suave masaje. Luego se transfirieron a un segundo contenedor con solución salina y se colocaron en un termo atemperado a 38 °C.
3. Se transportaron los ovarios al laboratorio inmediatamente.

Lavado de los ovarios:

Una vez llegaron los ovarios al laboratorio, fueron lavados con solución salina atemperada y masajeados suavemente varias veces para eliminar la mayoría de la sangre. Luego se colocaron los ovarios en un beaker conteniendo solución salina de transporte limpia y atemperada hasta la colección de los oocitos.

Recolección y maduración de los oocitos:

En la mañana se prepararon tres placas de maduración (placas de Petri redondas de 60 × 15 mm). Se prepararon microgotas flotantes de 50 µL de medio de maduración de oocitos (MMO), se cubrieron con aceite mineral y se llevaron a la incubadora a 5% de CO₂ y 38.5 °C a fin de gasificarlas tres horas antes de depositar los oocitos (estas microgotas estaban calculadas para poner 30 oocitos en cada una). Se marcaron las placas con iniciales y fecha.

Procedimiento:

Se utilizaron los ovarios con bastantes folículos y se botaron aquellos con cuerpos lúteos muy grandes y quistes (se debe utilizar guantes de látex sin talco). Los ovarios seleccionados se pusieron en un frasco limpio con el mismo medio de transporte (Solución Salina).

Se puso un beaker con 100 mL de medio de colección de oocitos (MCO) y cuatro tubos de policarbonato estériles con 5 mL cada uno de MCO en el baño María mínimo una hora antes a fin de que se atemperara (38 °C). Se debe tener todo el material desinfectado con etanol al 70% antes de trabajar; la mesa de trabajo donde se aspiraron los ovarios tiene que ser cubierta con papel toalla. En la platina térmica (38 °C) se puso una placa de búsqueda (grid) con MCO y una placa nunclon de cuatro pozos con MCO. Se preparó la pipeta de transferencia (Drummond), se desinfectó el émbolo con etanol y se puso la punta. Se preparó la lupa estereoscópica igualmente desinfectándola con etanol al 70%.

Para la aspiración de los ovarios se usaron jeringas de 5 mL de dos piezas y agujas calibre 18 × 1 ½ pulgadas. A medida que se fueron aspirando los folículos, el líquido folicular se depositó en los tubos de policarbonato de 50 mL. Una vez terminado el procedimiento de aspiración se dejaron reposar los tubos de 50 mL por cinco minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante muy suavemente teniendo cuidado de no crear turbulencia en el fondo ya que se pueden haber perdido oocitos, para este proceso se utilizó una pipeta de 1000 µL de alta precisión. Posteriormente este precipitado se vertió a la placa grid y cada uno de los tubos de 50 mL se lavó con MCO atemperado en dos ocasiones a fin de recuperar los oocitos que pudieron haber quedado pegados a las paredes del tubo.

Una vez realizado el procedimiento anterior, se comenzó la búsqueda y clasificación de los oocitos usando la pipeta Drummond y a medida que se fueron identificando y clasificando, fueron transferidos a uno de los pozos de la placa nunclon con MCO. Una vez finalizó la búsqueda, se lavaron en los cuatro pozos de la placa nunclon. Cuando se terminó el último lavado se pasaron de inmediato de diez en diez a cada microgota de las placas de maduración que estaban en la incubadora, se devolvieron las placas a la incubadora y se dejaron durante 24 horas para la maduración. Se escogieron oocitos bien rodeados con células del *cumulus oophorus*, con citoplasma homogéneo más bien obscuro y zona pelúcida intacta. No se escogen oocitos expandidos, ni desnudos.

Día 0.

Procedimiento 1:

Este procedimiento se realizó en la mañana del Día 0 (mínimo de dos a tres horas antes de la fertilización) de tal manera que todos los medios debieron estar hechos cuando se inició el procedimiento.

1. Se llenaron tres tubos cónicos de policarbonato de 15 mL con HEPES-SOF (H-SOF), se taparon y colocaron en la estufa a 38.5 °C. Dos de estos tubos fueron usados más tarde para el lavado de los oocitos.
2. Se adicionaron 10 mL de H-SOF a un tubo cónico de policarbonato de 15 mL, se marcó con el nombre de "lavado". Se tapó y se colocó en la estufa a 38.5 °C.
3. Se adicionaron 5 mL de SOF-FERT a un tubo cónico de policarbonato de 15 mL, se colocó en la incubadora de CO₂ sin tapa para permitir el intercambio de gases, con el fin de que la solución se gasificara.
4. Se prepararon suficientes platos Petri de 35 × 10 mm de acuerdo al número de oocitos que estaban madurando (200 oocitos/plato). Se adicionaron 1700 µL de SOF-FERT a cada plato y se permitió que el medio se equilibrara en la incubadora de CO₂ mínimo por dos horas.
5. Se colocaron en un tubo cónico de 15 mL, 1.5 mL de Percoll al 90% y 1.5 mL de H-SOF, o sea este fue el Percoll al 45%, se mezcló suavemente.
6. Se colocó en un tubo cónico de 15 mL, 3 mL de Percoll al 90%.

Procedimiento 2:

1. Dos o tres horas, antes del tiempo de fertilización, y calculando de 18 a 20 horas de maduración de los oocitos, se procedió a preparar el semen de la siguiente manera:
2. Con una pipeta Pasteur plástica se colocó muy lentamente en el fondo del tubo del Percoll al 45%, el Percoll al 90%, sin perturbar el medio. Se debió observar el menisco de separación entre el Percoll al 90% abajo y el Percoll al 45% arriba. Se llevó cuidadosamente a la incubadora con la tapa suelta dos horas antes de su uso. También se podía hacer al revés, colocar el Percoll al 45% a través de las paredes sobre el Percoll al 90%.
3. Se conectó la unidad descongeladora para calentar el agua a 38 °C.
4. Se colocó una alícuota de 400 µL de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) que debió estar cubierta con papel aluminio, en la estufa a 38.5 °C.

Procedimiento 3:

1. Se colocó una placa X (plato Petri con cuatro divisiones de igual área) en la platina térmica y se adicionó 3 mL de H-SOF en cada uno de los pozos.
2. Se removi6 uno a uno los platos que contenían los oocitos madurados y se colocaron en la platina térmica.
3. Se transfirieron los Complejos Oocitos *Cumulus* (COCs por sus siglas en inglés) en grupos sin contener MMO y se colocaron en una esquina de uno de los pozos de la placa X que contenía H-SOF.

4. Se repitió el procedimiento hasta que todos los COCs fueron colocados en grupos de 200 oocitos. Se lavaron los COCs por transferencia de una esquina a la próxima en el mismo plato, completando un total de 3 lavados.
5. Se retiró el plato Petri conteniendo el pre-equilibrado SOF-FERT (1700 µL/plato) desde la incubadora y se transfirió el grupo de oocitos lavados desde una esquina de la placa X.
6. Se retornó el plato a la incubadora lo más pronto posible hasta la fertilización.

Purificación del esperma usando el Percoll 45-90%.

Procedimiento:

Nota: es crítico que los espermatozoides no hayan sido expuestos a choque de frío. Un calentador en frente del área donde se prepararon y ejecutaron los procedimientos ayudó a prevenir el choque de frío.

Todos los medios utilizados estaban atemperados a 38 °C, y preparados al menos dos horas antes de la FIV (H-SOF, SOF-FERT, Percoll).

1. Se descongelaron tres pajuelas de semen en la unidad descongeladora por 45-60 segundos. Se puede utilizar un beaker con agua atemperada a 38 °C como alternativa. Una pajuela provee suficiente semen para fertilizar 100-120 oocitos, sin embargo, a menos que se escoja una raza en especial, se recomienda típicamente hacer un pool de tres toros (una pajilla por toro) para mejorar la probabilidad de que los espermatozoides de al menos un toro se desempeñen bien y fecunden.
2. Se retiró la pajuela y se secó con un paño desechable, se cortó la punta de la pajuela con las tijeras y se expelió el contenido encima del gradiente Percoll, lentamente cuidando de no causar un disturbio en el gradiente y que el semen quede en una capa encima del Percoll 45%. Se puede utilizar la pistola de inseminación desinfectada con etanol al 70% y dejándola por lo menos cuatro horas para que se seque y elimine los vapores.
3. Se colocó el tubo cónico conteniendo el semen y el gradiente de Percoll dentro del tubo de la centrífuga pre-calentado a 38 °C y fue centrifugado a 1000 × g por 10 minutos.

Para efecto del cálculo de las rpm se utilizó la siguiente fórmula (Fórmula 1):

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{g}{r \times 1.118}} \times 10^3 \quad [1]$$

Donde:

r = Radio de rotación, la distancia (mm) desde el centro del rotor al fondo del tubo de centrifugado en el cubo cuando se levanta en posición horizontal.

g = La fuerza centrífuga relativa (F.C.R.) es la fuerza requerida para que se produzca la separación. Las unidades de esta fuerza se expresan en número de veces el valor de la gravedad (x × g) fuerza centrífuga.

1.118 = Es una constante.

$10^3 =$ Constante.

4. Después de la centrifugación, se colectó el pellet de espermatozoides desde el fondo del tubo cónico con una pipeta Pasteur plástica. El pellet debió ser colectado sin Percoll, ya que este es tóxico para los espermatozoides.
5. Se colocó el pellet del semen dentro de un tubo cónico de 15 mL conteniendo 10 mL de H-SOF (marcado como "lavar") y se colocó en un tubo de centrifuga precalentado a 38 °C y se centrifugó por cinco minutos a $200 \times g$.
6. Se removió el sobrenadante con una pipeta Pasteur teniendo cuidado de no causar disturbios en el pellet. Este paso se realizó rápidamente porque los espermatozoides motiles comenzaron a nadar fuera del pellet. Si el pellet accidentalmente se disturba, detener el procedimiento y recentrifugar.
7. Se determinó la dilución requerida para llevar la dilución de espermatozoides a $17 \times 10^6/\text{mL}$ (esto producirá una concentración final de espermatozoides en el plato de fertilización de $1 \times 10^6/\text{mL}$). Para hacerlo, se llevó el pellet de semen a una suspensión de 600 μL usando el SOF-FERT pre-equilibrado. Se adicionó 10 μL de la suspensión de semen a 90 μL de agua para matar los espermatozoides (1:10). Se cargaron 10 μL en las dos cámaras del hemocitómetro. Se contaron el número de espermas en cinco cuadros de cada cámara, y se usó el promedio de ambas cámaras para la cuenta final del conteo de espermas.
8. Para obtener el volumen de SOF-FERT necesario para llevar los espermatozoides a la concentración de $17 \times 10^6/\text{mL}$ se usó la siguiente fórmula (Fórmula 2):

$$\frac{\text{Vol.} \times \text{número de células} \times 50,000 \times 10}{17,000,000} - \text{Vol.} \quad [2]$$

Donde:

- Vol.: es la dilución inicial de los espermatozoides (600 μL).
- Número promedio de espermatozoides contado.
- 50,000 es el ajuste para determinar la concentración de espermatozoides por mL.
- 10 es el factor de dilución de los espermatozoides antes del conteo.

Alternativamente adicionar 0.5 a 1.0 mL de SOF-FERT pre-equilibrado al pellet con los espermatozoides (a mayor tamaño del pellet, mayor la cantidad de SOF-FERT a adicionar al pellet) y mirar la concentración de células espermáticas hasta que se aproxime a $17 \times 10^6/\text{mL}$.

Fertilización.

Procedimiento:

1. Se removieron los platos conteniendo los oocitos madurados desde la incubadora y se colocaron en la platina térmica.
2. Se adicionaron 120 μL de la solución de espermatozoides y 80 μL PHE, se mezclaron en cada plato. Cuando se pipeteó la solución de espermatozoides se hizo de la parte media de la suspensión y no del fondo para evitar aspirar basuras y restos celulares del fondo del tubo.
3. Se retornaron los platos a la incubadora por 18 horas.

Preparación de las gotas para cultivo de los embriones.

Procedimiento:

1. Se preparó el medio de cultivo (SOF-BE1) al menos dos horas antes de remover los embriones/oocitos de las gotas de fertilización
2. Se hicieron suficientes microgotas de 50 μ L de medio de cultivo en platos Petri de 60 \times 15 mm y se cubrieron con aceite mineral. También se pueden preparar microgotas de 25 μ L cuando se desean cultivar pequeñas cantidades de embriones. Típicamente se coloca 25-30 embriones en microgotas de 50 μ L y 5 a 10 embriones en microgotas de 25 μ L.
3. Colocar los platos en la incubadora de gases.

Procedimiento:

1. Se lavó un tubo Eppendorf de 1.5 mL con H-SOF y se dejó una pequeña cantidad de H-SOF (~50 μ L) en él.
2. Se colocó una placa X en la platina térmica y se adicionaron 5 mL de H-SOF en cada uno de los pozos.
3. Luego que el microscopio y el aire han sido calentados a 38 °C, se removió un plato de fertilización de la incubadora.
4. Se removieron los COC's (ahora son llamado cigotos putativos ya que muchos de ellos fueron fertilizados) de los platos de fertilización y se colocaron en los tubos de microcentrífuga (Eppendorf). Máximo 300 embriones pueden ser cargados en un tubo de microcentrífuga.
5. Se repitieron los pasos tres y cuatro hasta que todos los platos hayan sido procesados.
6. Se removieron las células del *cumulus* de los embriones/oocitos por vórtex colocando el tubo de microcentrífuga por cuatro minutos. Una buena técnica es presionar el tubo fuerte y luego que el fluido es propulsado a la tapa del tubo, retirarlo y hacerlo hasta remover las células del *cumulus*. El remover las células del *cumulus* es imperativo.
7. En un tubo de microcentrífuga se agregó una alícuota de 100 μ L de hialuronidasa (Solución 12) mezclada con 600 μ L de H-SOF precalentado, luego el tubo es colocado en la incubadora por cinco minutos antes de adicionar los cigotos putativos. Luego de que los cigotos se han depositado en el fondo del tubo, se eliminó el exceso de medio (menos de 300 μ L para prevenir que los cigotos se vayan a la tapa del tubo).
8. Se transfirieron los cigotos putativos del tubo de microcentrífuga a un pozo de la placa X y se lavó el tubo de microcentrífuga por 2-3 veces con H-SOF a fin de recuperar todos los embriones.
9. Se lavaron los embriones/oocitos dos veces por transferencia de un pozo al próximo para eliminar todas las células desbridadas. Notar que en el paso ocho: para evitar el derramamiento, se dejó un pozo vacío, se colocó H-SOF en los pozos dos, tres y cuatro. Se adicionaron los embriones/oocitos al pozo uno y se lavó el tubo de microcentrífuga 2-3 veces con H-SOF del pozo cuatro. Se removieron todas las burbujas con una pipeta, esto ayudó a la visualización de los embriones y se colocaron las burbujas en el pozo cuatro (porque los embriones algunas veces se pegan de las burbujas). Se transfirieron los embriones secuencialmente de pozo a pozo, del uno al dos al tres.

10. Finalmente, se transfirieron los cigotos putativos a las microgotas de medio SOF-BE1 pre-equilibrado.

Cultivo de embriones: Día 1 a 9.

Nota: Los procedimientos realizados del día 1 al 9 son los mismos para los protocolos SOF y TALP.

Día 3 pos FIV- determinación del desarrollo embrionario:

1. Se pre-calentó el microscopio invertido a 38 °C con un calentador cerca de él 15 minutos antes de uso.
2. Se determinó el índice de desarrollo embrionario por el número de células (división celular o clivaje) de los presuntos embriones puestos inicialmente en las microgotas. Se retornaron las placas a la incubadora.

Día 5 pos FIV- adición de suero.

1. Se colocó el tubo Eppendorf de suero fetal inactivado con calor (Solución 24) en la incubadora 1-2 horas antes de agregar a las microgotas que contienen los embriones.
2. Se pre-calentó el aire colocando el calentador delante de la platina térmica.
3. Se colocaron las placas en la platina térmica, se agregaron 5 µL de suero fetal bovino sometido a un tratamiento térmico filtrado estéril por cada embrión y se devolvieron a la incubadora.

Días 7 a 9 pos FIV- evaluación final.

1. Se pre-calentó el microscopio invertido a 38 °C, se colocó el calentador cerca del microscopio 15 minutos antes del uso.
2. Se determinó el desarrollo de embriones y la etapa de blastocisto.

Descripción del protocolo Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALP):

En el Anexo 3 se presentan las formulaciones para la preparación de las soluciones stock del protocolo TALP.

En el Anexo 4 se presentan los pasos para la preparación de los medios del protocolo TALP.

Día 1:

Nota: Es el mismo procedimiento realizado con el protocolo SOF pero se utilizan el MCO y el MMO del protocolo TALP.

Día 0.

Se prepararon las placas de fertilización y el semen. Esto se hizo 2 a 3 horas antes de la fertilización.

Se suplementó el medio de IVF-TALP (frasco de 100 mL nuevo).

1. Se pesaron 0.6 g de Albumina Sérica Bovina Libre de Ácidos Grasos Esenciales (EFAF BSA por sus siglas en inglés), se añadieron al frasco de IVF-TALP y se diluyeron muy suavemente.
2. Se agregó 1 mL de piruvato de sodio (Solución 2, debió estar forrado con papel aluminio).
3. Se agregaron 100 μ L de gentamicina (Solución 8), previamente descongelada en baño maría a 38 °C por cinco minutos.
4. Se agregaron 500 μ L de heparina (Solución 7), previamente descongelada en baño maría por cinco minutos. Mientras se dejó mezclar bien el medio, se procedió a preparar los tubos cónicos.
5. Se filtró el medio de IVF-TALP a través de un filtro milipore 0.20 μ m en otro frasco estéril.
6. Se llenaron completamente cuatro tubos cónicos de 15 mL con Hepes TALP (Hepes TL) se sellaron y se llevaron a la estufa.
7. Se añadieron 10 mL en un tubo cónico de 15 mL de Hepes TL. Se tapó y se llevó a la estufa. Se marcó con la palabra “Lavado” en la etiqueta.
8. Se agregaron 5 mL de IVF-TALP a un tubo cónico de 15 mL y se puso la tapa sin cerrarla y se llevó a la incubadora (a fin de que se equilibraran los gases).
9. Se prepararon las placas de fertilización de cuatro pozos, según el número de oocitos que se estaban madurando, se añadieron 600 μ L de IVF-TALP, se calculó más o menos 30 oocitos por pozo y se llevaron a la incubadora. Se marcaron las placas con iniciales y fecha.
10. Luego se preparó el Percoll 45%: Se agregó a un tubo cónico de 15 mL, 1.5 mL de Percoll al 90% y 1.5 mL de Sperm-TALP (SP-TL por sus siglas en inglés). Se agregó a un tubo cónico de 15 mL, 3 mL de Percoll al 90%. Los dos Percoll (45 y 90%) se colocaron a gasificar por lo menos dos horas antes de utilizarlos.

Procedimiento:

Dos o tres horas, antes del tiempo de fertilización, y calculando de 18 a 20 horas de maduración de los oocitos, se preparó el semen de la siguiente manera:

Con una pipeta Pasteur plástica se puso muy lentamente en el fondo del tubo del Percoll al 45%, el Percoll al 90%, sin perturbar el medio. Se observó el menisco de separación entre el Percoll al 90% abajo y el Percoll al 45% arriba. Se pasó cuidadosamente a la incubadora.

Se sacó del congelador el tubo Eppendorf que tenía la Solución de PHE, se tapó con papel de aluminio y se colocó en la estufa (38.5 °C). Así mismo, se alistaron los contenedores de la centrifuga y las pipetas Pasteur plásticas. Se preparó el microscopio con platina térmica para evaluar el semen. Por otro lado, se puso una servilleta en el mesón y se colocó encima la tijera y la pistola de inseminación.

Se preparó una placa nunclon de cuatro pozos con el Hepes TL que estuvo en la estufa, se llenaron dos de los cuatro pozos y se puso sobre la platina calentadora. Donde se trabajó el semen hubo un calentador, para evitar de un shock de frío a los espermatozoides.

Luego se sacaron tres pajillas de semen de toros diferentes, se descongelaron por 45-60 segundos a 38 °C y se secó bien cada una de las pajuelas. Se cortó la pajuela con la tijera y se montó la pistola de inseminación, se empujó suavemente el semen sobre el Percoll que estaba en la incubadora. El semen tuvo que colocarse sin perturbar el medio, encima del gradiente de 45%. Se pusieron las tres pajuelas sobre el Percoll y se pusieron en el contenedor de la centrífuga que debió haber estado en la estufa. Se centrifugó a $1000 \times g$ por 10 minutos (ver conversión a rpm en la parte del SOF-FERT).

Mientras se esperaban los diez minutos, se sacaron las placas con los oocitos maduros y se pasaron del MMO a la placa nunclon de cuatro pozos que estaba encima de la platina calentadora con Hepes TL, se lavaron en los pozos haciendo grupos de 30 oocitos para facilitar y agilizar la transferencia. Una vez lavados los oocitos, se sacó la placa de fertilización de la incubadora, la cual contiene IVF-TALP y que previamente se había colocado a gasificar, se transfirió con la pipeta Drummond 30 oocitos por pozo. Se volvió a llevar la placa para la incubadora. Este procedimiento se hizo con la mayor brevedad posible.

Una vez que se terminaron los 10 minutos de centrifugación, se extrajo el pellet del fondo del tubo con una Pasteur y se colocó en el tubo que tenía SP-TL. Se trató de tomar únicamente el pellet porque el Percoll es tóxico para los espermatozoides. No debe perturbarse el medio. Se puso en otro contenedor de la centrífuga que previamente se había colocado en la estufa y se llevó a centrifugación a $200 \times g$ por cinco minutos. Luego se desechó el excedente, sin perturbar el medio y se tomó únicamente el pellet del fondo del tubo. Si se mezclaba el medio había que centrifugarlo de nuevo. Este procedimiento se hizo rápido porque los espermatozoides comenzaban a moverse del pellet. A este pellet se le añadió el medio IVF-TALP que se tenía en la incubadora (0.5 mL). Se pipetearon muy suavemente los espermatozoides. De aquí se tomó una muestra y se observó al microscopio. Se calculó la motilidad individual de los espermatozoides sin usar laminilla. Mientras tanto el semen se dejó en la estufa. Posteriormente, se sacaron las placas de fertilización de la incubadora y se pusieron sobre la platina calentadora. Se agregaron 120 μL de semen por pozo (se tomó la dosis de la mitad de la suspensión) y 80 μL de PHE que estuvo en la estufa. Se llevó la placa a la incubadora por 18 horas.

Preparación Cultivo de los Embriones.

Al cabo de las 16 horas luego de la fertilización se prepararon las microgotas flotantes de 50 μL con el medio SOF suplementado, se cubrieron con aceite mineral y se llevaron a la incubadora a 5% de CO_2 y 38.5 °C, calculando dos horas antes de terminar el tiempo de fertilización. Se puso en la platina calentadora una placa X a la cual se le agregó Hepes-TL en tres de los cuatro pozos. También se puso un beaker de 50 mL con Hepes-TL. Se tomó un tubo Eppendorf con hialuronidasa del congelador y se colocó en la estufa. Una vez descongelado, se le agregó con una micropipeta 1 mL de Hepes-TL que estuvo en la estufa, se diluyó bien y se colocó sobre la platina calentadora. Se sacó la placa de fertilización de la incubadora y se transfirieron los presuntos oocitos fertilizados con la pipeta Drummond al tubo Eppendorf. Se dejó reposar por dos a tres minutos y se extrajo el excedente del medio con mucho cuidado dejando solo la parte final del tubo donde se encontraban sedimentados los embriones. Luego se llevó al vortex durante 5 minutos. Después se le añadió con una pipeta Pasteur plástica Hepes-TL y se lavó bien el tubo Eppendorf,

incluyendo la tapa y se colocó en la placa X en el pozo que no tenía medio. Luego se lavaron los embriones agrupándolos de a 30 en cada pozo de la placa X. Se lavaron tres veces. Luego se sacó la placa de cultivo que estaba en la incubadora y se transfirieron los embriones a razón de 10 embriones por microgota.

Cultivo de embriones: Día 1 a 9. Se realizó el mismo procedimiento descrito en el protocolo SOF.

Se determinaron las siguientes variables (para ambos protocolos):

- Porcentaje de maduración *in vitro*.
- Porcentaje de fertilización *in vitro*.
- Porcentaje de clivaje.
- Porcentaje de apoptosis.
- Porcentaje de embriones obtenidos (blastocistos).

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (protocolo SOF y protocolo TALP) y dos repeticiones por tratamiento. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba de distribución de frecuencias Chi-cuadrado (χ^2) aplicando el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS 2009) con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolección de oocitos. Los oocitos fueron extraídos de ovarios de vacas *post mortem* utilizando la técnica de punción folicular. Se clasificaron como aptos aquellos oocitos bien rodeados con células del *cumulus oophorus*, con citoplasma homogéneo más bien obscuro y zona pelúcida intacta. Se consideraron degenerados aquellos oocitos expandidos y desnudos (Figura 1).

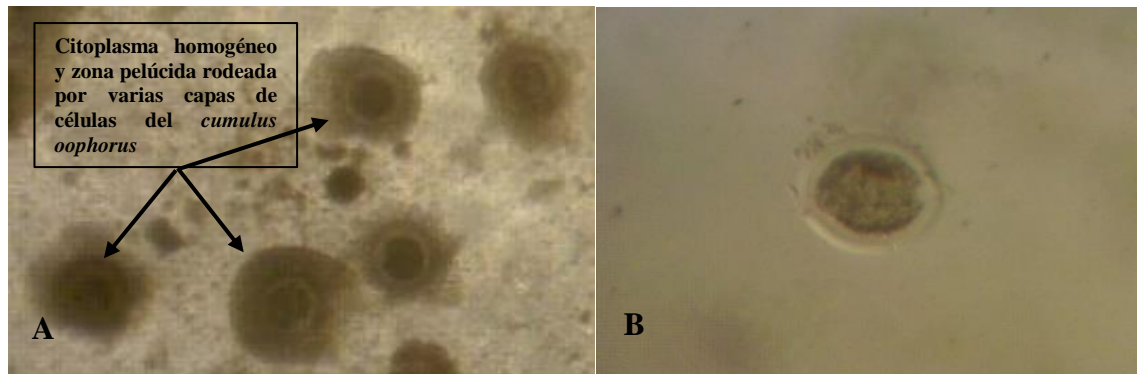


Figura 1. Oocitos recolectados. A) Oocitos viables. Nótese los citoplasmas homogéneos y rodeados por varias capas densas de células del *cumulus oophorus*. B) Oocito degenerado. Nótese el citoplasma traslúcido, fragmentado al igual que la zona pelúcida fragmentada y ausencia total de células del *cumulus oophorus*.

Para el protocolo SOF se aspiraron 46 ovarios obteniendo 262 oocitos, de los cuales 101 oocitos (38.55%) se clasificaron como degenerados y 161 oocitos (61.45%) fueron viables, obteniendo un promedio de 3.5 oocitos viables/ovario. Para el protocolo TALP se punzaron 14 ovarios, obteniendo 60 oocitos, de los cuales 21 oocitos (35%) se clasificaron como degenerados y 39 oocitos (65%) fueron viables, resultando en un promedio de 2.8 oocitos viables/ovario. Las diferencias no fueron significativas entre los protocolos ($P > 0.05$) para las variables de oocitos viables/recolectados y oocitos viables/ovario (Cuadro 1). Esto se atribuye a que los ovarios utilizados para ambos protocolos tenían similitud en cuanto a su calidad (provinieron de vacas de descarte) y fueron aspirados por el mismo operador.

Resultados similares fueron encontrados por Huang et al. (2008) quienes reportaron que el número de oocitos viables por ovario varía en un rango de 3.18 a 2.8. García Recilla y Martínez Quintero (2013) hicieron un estudio en el que extrajeron 444 oocitos, de los cuales 292 (65.76%) fueron viables, obteniendo un promedio de 4.2 oocitos viables/ovario. La

diferencia en la cantidad de oocitos viables/ovario se atribuye a la edad, estado nutricional y reproductivo de los animales aspirados y a la experiencia del operador.

Cuadro 1. Oocitos aspirados viables y degenerados.

Protocolo	Ovarios aspirados	Oocitos recolectados	Oocitos viables	Oocitos degenerados	Oocitos viables/ovario
SOF	46	262	161 (61.45%)	101 (38.55%)	3.5
TALP	14	60	39 (65%)	21 (35%)	2.8
P			0.6092		> 0.05

Porcentaje de maduración *in vitro*. Los oocitos categorizados como madurados fueron aquellos que poseían un *cumulus oophorus* denso y expandido, el cual cubría el total del oocito con un citoplasma uniformemente granulado y obscuro (Figura 2).

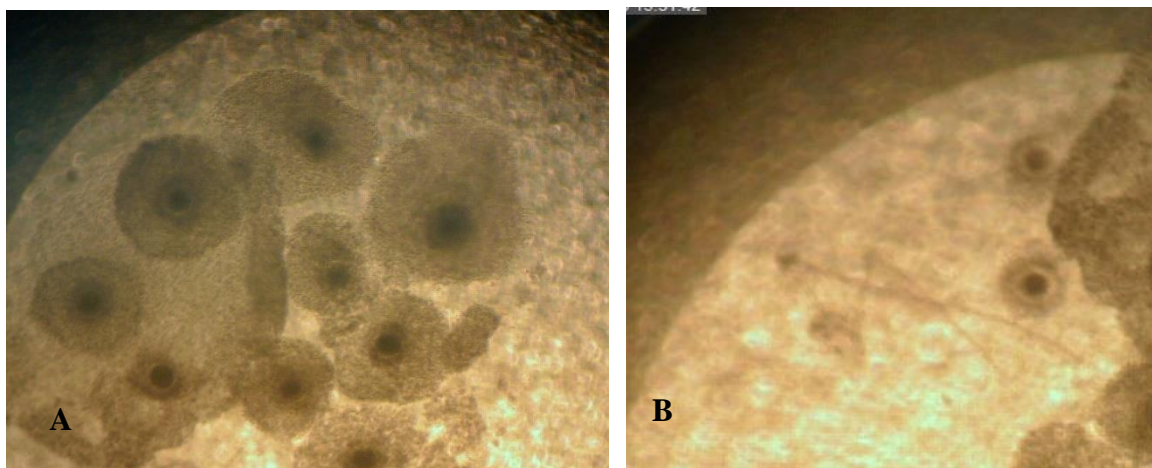


Figura 2. Oocitos con 24 horas en medio de maduración. A) Oocitos madurados. B) Oocitos no madurados.

Para el protocolo SOF se colocaron a madurar 161 oocitos viables, de estos se categorizaron 92 (57.14%) como oocitos maduros y 69 oocitos (42.86%) como inmaduros. Para el protocolo TALP se pusieron a madurar 39 oocitos viables, obteniendo 36 (92.31%) oocitos maduros y 3 oocitos (7.69%) inmaduros. Se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los protocolos en el número de oocitos madurados (Cuadro 2).

Esta diferencia se le atribuye posiblemente a la proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que contiene el MMO del protocolo TALP, la cual estimula el desarrollo y crecimiento de células y tejidos. El MMO del protocolo SOF carece de esta proteína. De igual modo esta diferencia se le atribuye a la cantidad de glutamina (aminoácido no esencial) usada en el MCO de los protocolos TALP y SOF, 4 y 2.5 mL, respectivamente.

La glutamina tiene entre sus principales funciones intervenir en los mecanismos de eliminación del amoníaco; actuar como un tampón evitando la acidosis, favoreciendo así los procesos metabólicos; hacer parte de otros aminoácidos; estimular la producción de glucógeno, el cual es una fuente de energía para las células; y proteger a las células de la acción de los radicales libres (hace parte del glutatión que es un agente antioxidante). Por lo tanto, una mayor cantidad de este compuesto en el MCO del protocolo TALP está relacionado con una mejor capacidad y aptitud de los oocitos para su maduración.

Cuadro 2. Porcentaje de maduración *in vitro* para los protocolos SOF y TALP a las 24 horas.

Protocolo	Oocitos a madurar	Oocitos madurados	Oocitos no madurados
SOF	161	92 (57.14%) a [‡]	69 (42.86%) a
TALP	39	36 (92.31%) b	3 (7.69%) b
P		< 0.0001	

[‡] Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, en otros estudios de fertilización *in vitro*, Sánchez Sánchez (2014) en un estudio de evaluación de los medios SOF y Charles Rosenkrans 1 amino-ácidos (CR1aa) obtuvo un porcentaje de oocitos madurados de 85.2% con el medio SOF y 77.1% con el medio CR1aa, evidenciando mayor eficiencia en las relaciones oocitos madurados/viables utilizando el medio SOF. Robledo Verduzco et al. (2009) compararon dos protocolos, Medio de Cultivo Tisular 199 (TCM-199) y Medio de Cultivo para Embriones de Hámster 9 (HECM-9), obteniendo porcentajes de maduración de 73.3 y 71.4%, respectivamente; sin encontrar diferencias significativas entre ambos.

Porcentaje de oocitos fertilizados. Los oocitos que lograron ser fertilizados fueron aquellos en los cuales un espermatozoide logró atravesar la zona pelúcida, dando como resultado la formación de un cigoto putativo (Figura 3).

En el protocolo SOF se colocaron 92 oocitos madurados a fertilizar, se obtuvo un porcentaje de fertilización de 9.78% (9 oocitos) y un porcentaje de no fertilizados de 90.22% (83 oocitos). En el protocolo TALP se pusieron a fertilizar 36 oocitos maduros, se obtuvo un porcentaje de fertilización de 58.33% (21 oocitos) y un porcentaje de no fertilizados de 41.67% (15 oocitos). Para la tasa de fertilización se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los protocolos SOF y TALP (Cuadro 3). La mayor tasa de fertilización obtenida en el protocolo TALP está estrechamente relacionado con la mayor tasa de maduración y calidad de los oocitos madurados que se alcanzó con este protocolo. Esto se debe a que uno de los cambios más visibles en el oocito después de su maduración, es la expansión de las células del *cumulus oophorus*. Al ocurrir la expansión, el *cumulus* se torna laxo y adherente, propiedad que le permite al espermatozoide adherirse y penetrar a través de la matriz en su camino al oocito. Por otro lado, el *cumulus* establece un microambiente que facilita la capacitación espermática, ofreciendo así óptimas condiciones a los espermatozoides

hiperactivados en dirección al oocito. La presencia del *cumulus* previene el endurecimiento prematuro de la zona pelúcida del oocito, la cual conduciría a una menor penetración espermática.

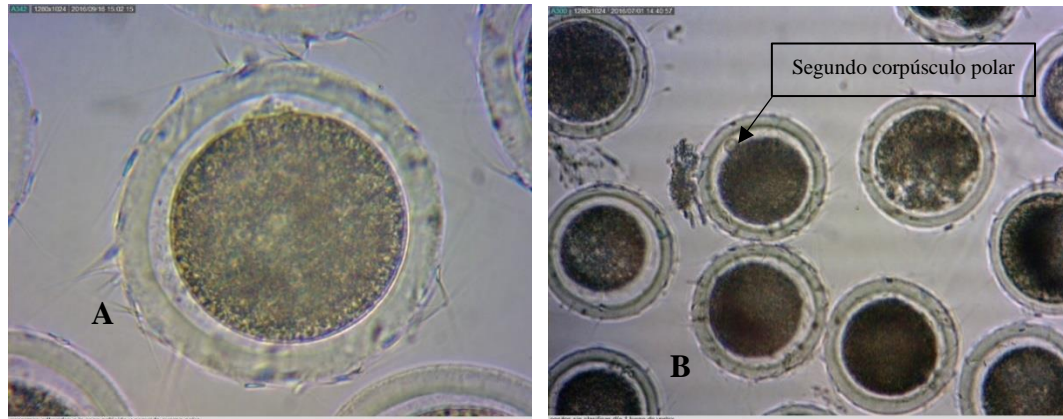


Figura 3. Oocitos con 18 horas en medio de fertilización. A) Espermatozoides adheridos a la zona pelúcida. B) Oocitos fertilizados (cigotos putativos).

Cuadro 3. Porcentaje de fertilización *in vitro* para los protocolos SOF y TALP a las 18 horas.

Protocolo	Oocitos madurados a fertilizar	Oocitos fertilizados	Oocitos no fertilizados
SOF	92	9 (9.78%) a [‡]	83 (90.22%) a
TALP	36	21 (58.33%) b	15 (41.67%) b
P		< 0.0001	

[‡] Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$).

En un estudio llevado a cabo por García Recilla y Martínez Quintero (2013) en el cual se implementó el protocolo TALP, y en cual se realizaron dos repeticiones, se obtuvieron porcentajes de fertilización de 45.16 y 41.66%, respectivamente. Fernández et al. (2007) realizaron tres ensayos de fertilización *in vitro* reportando un promedio de fertilización de 73.3%; en los tres ensayos, tanto para la maduración como para la fertilización de los oocitos, se implementó el protocolo de medio de cultivo modificado con líquido folicular humano (HTF). Sánchez Sánchez (2014) comparando los medios CR1aa y SOF reportó tasas de fertilización de 51.4 y 69.5%, respectivamente.

Porcentaje de clivaje y apoptosis. Se conoce como clivaje a la división celular embrionaria (segmentación del cigoto), a estas divisiones se les conoce como blastómeras. Apoptosis es la muerte celular programada provocadas por ellas mismas (Figura 4).

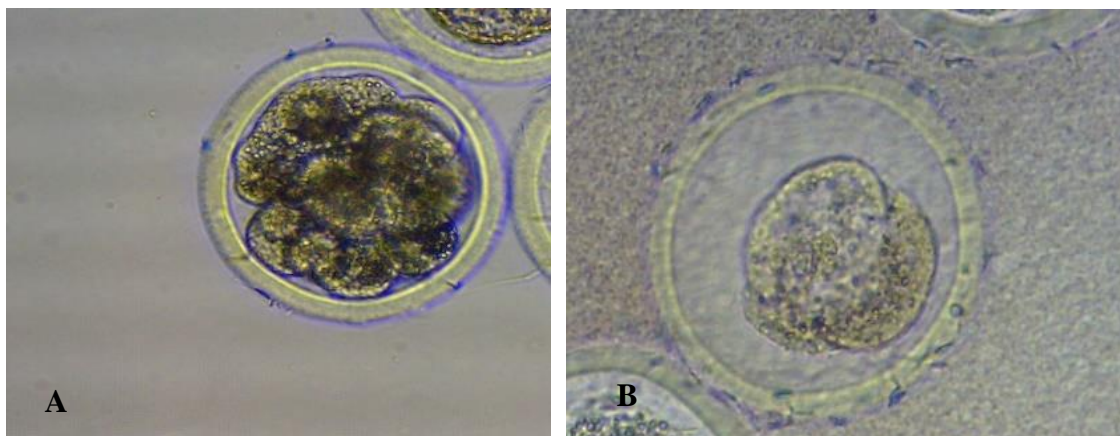


Figura 4. Oocitos luego del cuarto día de fertilizado. A) Oocito en clivaje. B) Oocito en apoptosis.

Con el protocolo SOF se obtuvo un porcentaje de división celular embrionaria (clivaje) de 22.22% y un porcentaje de muerte celular programada (apoptosis) de 77.78%. Con el protocolo TALP se obtuvieron porcentajes de clivaje y apoptosis de 47.62 y 52.38%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para los porcentajes de oocitos en clivaje y oocitos en apoptosis (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de clivaje y apoptosis para los protocolos SOF y TALP.

Protocolo	Oocitos fertilizados a 18 horas	Oocitos en clivaje	Oocitos en apoptosis
SOF	9	2 (22.20%)	7 (77.78%)
TALP	21	10 (47.62%)	11 (52.38%)
P		0.1932	

A pesar de que las diferencias encontradas entre ambos protocolos no fueron significativas, el protocolo TALP presentó un 25.42% más en la tasa de oocitos en clivaje. Esta superioridad se les atribuye a los medios de cultivo utilizados. El medio de cultivo usado en el protocolo TALP contiene ITS (insulina transferrina selenio), y el medio de cultivo del protocolo SOF carece de este suplemento. La insulina es una hormona polipeptídica, la cual interviene en el aprovechamiento metabólico de los nutrientes, especialmente de los glúcidos; por esta razón estimula la toma de glucosa por las células y favorece el transporte de glucosa al embrión. La transferrina es una glicoproteína que tiene una actividad antioxidante en los sistemas biológicos; y el selenio es un mineral constituyente del sitio activo de la enzima glutatión peroxidasa, por lo que regula su actividad biológica y previene el daño oxidativo en cultivos celulares. Por estas funciones de sus componentes, la adición de ITS al medio de cultivo ayuda a mejorar el crecimiento celular y el desarrollo embrionario.

En otros estudios utilizando como medio de cultivo el SOF, Boni et al. (1999) obtuvieron una tasa de clivaje de 78%. Kuran et al. (2002) reportaron tasas de división celular de 62 a 76%; Lonergan et al. (2003) reportaron tasas de división embrionaria de 81.4%; Iwata et al. (2004) reportaron tasas de división de 60 a 76%; Dhali et al. (2009) obtuvieron una tasa de división de 71% y Li et al. (2009) reportaron una tasa de división de 70% (todos estos estudios fueron realizados con el medio de cultivo SOF). Ahuja Aguirre et al. (2009) obtuvo una tasa de división de 82.3% para ovocitos cultivados en medio optimizado simple de potasio (KSOM).

Porcentaje de embriones obtenidos al séptimo día. Luego de que comienza la segmentación del cigoto se forma una masa compactada llamada mórula (Figura 5), que forma la blástula. El estado embrionario al séptimo día es llamado blastocisto.

Para el protocolo SOF se obtuvo un porcentaje de blastocistos al séptimo día de 100% con un total de 2 embriones aptos para implantar y/o criopreservar. Con el protocolo TALP se obtuvieron un total de 7 embriones producidos con un porcentaje de blastocistos al séptimo día de 70%. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los protocolos para el porcentaje de blastocistos obtenidos (Cuadro 5). Esto se atribuye a que la eficiencia de un medio de cultivo, cualquiera en particular, tiene más impacto en las primeras fases de división embrionaria (día 1 a 3). Luego de que los embriones alcanzan el estadio de mórula (día 4) su tasa de sobrevivencia aumenta. Por esta razón la eficiencia de los medios de cultivo utilizados para los protocolos TALP y SOF, tiene mayor influencia en las tasas de clivaje.

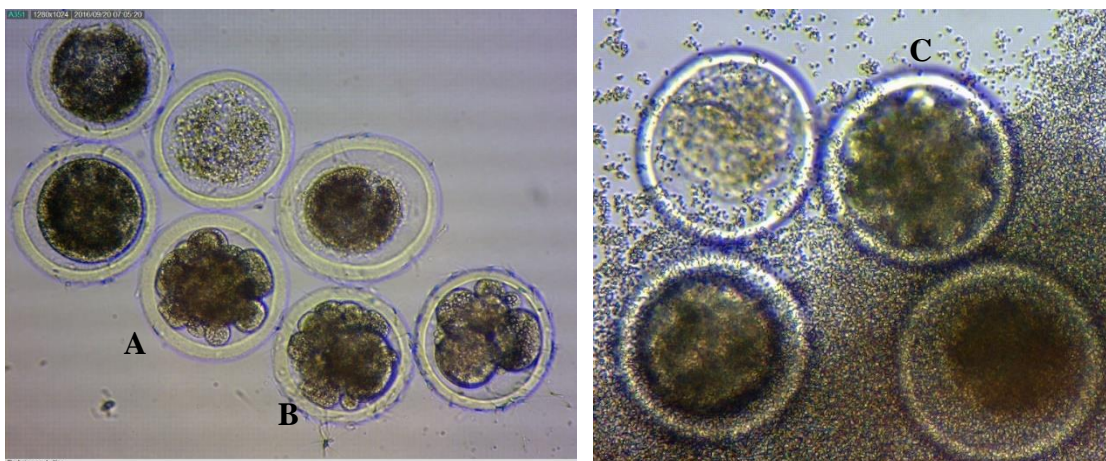


Figura 5. Izquierda: A y B mórulas obtenidas al día 4 de cultivo; Derecha: C blastocisto temprano al día 7.

En un estudio utilizando como medio de cultivo el CR1aa (medio CR1 adicionado con aminoácidos esenciales y no esenciales), Urrego et al. (2008) obtuvieron una tasa de blastocistos de 20%. Usando como medio de cultivo SOF, Boni et al. (1999) y Kuran et al. (2002) obtuvieron tasas de blastocistos de 28 y 36%, respectivamente, del total de

embriones divididos. Fernández et al. (2007) obtuvieron como promedio una tasa de blastocistos de 4.7% al implementar el protocolo HTF en 3 ensayos diferentes.

Cuadro 5. Porcentaje de embriones obtenidos a los siete días de cultivo con los protocolos SOF y TALP.

Protocolo	Oocitos en clivaje	Embriones obtenidos
SOF	2	2 (100%)
TALP	10	7 (70%)
P		0.3711

Eficiencias obtenidas para los protocolos TALP y SOF. En la actualidad, las eficiencias de los protocolos para cada etapa de FIV se evalúan de acuerdo al proceso anterior. Así, por ejemplo, la tasa de división embrionaria se evalúa en base a la cantidad de oocitos fertilizados. En este estudio se consideró relevante evaluar la eficiencia para los protocolos TALP y SOF durante todo el proceso de la FIV, en base a la cantidad de oocitos viables obtenidos al inicio de cada ensayo. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ambos protocolos en cada etapa de la FIV en base a la cantidad de oocitos viables (Cuadro 6). Estas diferencias concuerdan con los resultados obtenidos en las tasas de maduración, fertilización y clivaje de cada protocolo, siendo siempre el protocolo TALP superior al protocolo SOF por los argumentos ya explicados anteriormente en cada etapa.

Cuadro 6. Eficiencia de los protocolos SOF y TALP durante el proceso de fertilización *in vitro*.

Tratamiento	Oocitos viables	Oocitos maduros/viables	Oocitos fertilizados/viables	Oocitos clivaje/viables	Blastocistos/oocitos viables
SOF	161	57.14% a [‡]	5.59% a	1.24% a	1.24% a
TALP	39	92.31% b	53.85% b	25.64% b	17.95% b
P		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

[‡] Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este estudio, los mayores porcentajes de maduración y fertilización *in vitro* se obtuvieron con el protocolo TALP.
- Los porcentajes de clivaje, apoptosis y embriones obtenidos al séptimo día fueron similares entre los protocolos.
- La mayor eficiencia en las relaciones oocitos maduros/viables, oocitos fertilizados/viables, oocitos en clivaje/viables y blastocistos/oocitos viables se obtuvo con el protocolo TALP.

5. RECOMENDACIONES

- Bajo las condiciones del Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano, se recomienda hacer uso del protocolo TALP para trabajos de Fertilización *in vitro*, tanto para fines investigativos como productivos.
- Realizar futuras investigaciones transfiriendo embriones obtenidos mediante el protocolo TALP, para determinar el porcentaje de implantación de los mismos.

6. LITERATURA CITADA

- Ahuja Aguirre C, Montiel Palacios F, Hernández Pérez P, Gallego Sánchez J. 2009. Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Trop.* 3(27):281; [consultado 2015 Nov 23]. <http://www.scielo.org.ve/pdf/zt/v27n3/art07.pdf>.
- Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. 1999. Intercellular communication in in vivo-and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod.* 61(4):1050–1055.
- Dhali A, Anchamparathy VM, Butler SP, Pearson RE, Gwazdauskas FC. 2009. In vitro development of bovine embryos cultured with stem cell factor or insulin-like growth factor-I following IVF with semen of two bulls having different field fertility. *Anim Reprod Sci.* 116(3–4):188–195. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.02.007.
- Fernández A, Díaz T, Muñoz G. 2007. Producción in vitro de embriones bovinos. *Rev Fac Cs Vets.* (1):51–60; [consultado 2015 Sep 18]. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2950696>.
- García Recilla J, Martínez Quintero JL. 2013. Implementación de un protocolo de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano [Tesis]: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 34 p.
- Gonella Diaza ÁM, Atuesta Bustos JE, Bernal Ulloa SM, Chacón Jaramillo L. 2013. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.* 4(1):65–80. <http://search.proquest.com/docview/1470877485?pq-origsite=gscholar>.
- Huang F, Chen M, Li R, Li Z, Liang X, Pang C, Qin G, Yang C, Zhang X. 2008. In Vitro Fertilization and Subsequent Embryo Development Using Oocytes Derived from Abattoir Ovaries in Different Seasons in Buffalo. *China Anim Husbandry Vet Med.* 7:21–46; [consultado 2016 Jun 20]. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-GWXXK200807021.htm.
- Iwata H, Hashimoto S, Ohta M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Soc Reprod Fertility.* 127(2):159–164; [consultado 2016 Feb 25]. <http://www.reproduction-online.org/content/127/2/159.short>.
- Kuran M, Robinson JJ, Brown DS, McEvoy TG. 2002. Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after in vitro production in contrasting culture systems- United States of America: Scottish Agricultural College, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, UK, and Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9SB, UK; [consultado 2015 Nov 24]. http://www.researchgate.net/publication/11284598_Development_amino_acid_utilization_and_cell_allocation_in_bovine_embryos_after_in_vitro_production_in_contrasting_culture_systems.

- Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ, Shorgan B. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci.* 114(1–3):89–98. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.018.
- Loneragan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Soc Reprod Fertility.* 126(3):337–346. doi:10.1530/rep.0.1260337.
- Mejía Isaza V, Arango Duque S, Pareja Lopez A, Camargo Rodriguez O, Urrego Alvarez R. 2009. Evaluación de dos medios de cultivo sobre la producción in vitro de embriones bovinos. *CES Med Vet Zootec.* 4(2); [consultado 2015 Nov 22]. <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/1027>.
- Peláez V. 2011. Producción in vitro de embriones bovinos [Tesis]: Universidad de Cuenca-Ecuador. 86 p.
- Robledo Verduzco JM, Herrera Camacho J, Cajero Juárez M, Navarro Maldonado MC, García Valladares A. 2009. Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Trop Subtrop Agroecosyst.* 10(1):95–99; [consultado 2016 Jul 10]. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243009>.
- Sánchez Sánchez BM. 2014. Comparación de dos medios de cultivo in vitro: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano [Tesis]: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 33 p.
- Urrego R, Tarazona A, Olivera Ángel M, Camargo O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Rev Colom Cienc Pecu.* 21(3):398–405; [consultado 2016 Aug 18]. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902008000300009.

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de las soluciones stock para el protocolo SOF

Solución 1: Lactato de Sodio. Comprar a 98% (Sigma). Seguir las indicaciones del fabricante para la fecha de vencimiento. Almacenar a 4 °C.

Solución 2: Piruvato de Sodio. Disolver 0.220 g de piruvato de sodio en 100 mL de agua. Esterilizar, filtrar a 0.20 µm y preparar alícuotas de 3 mL en tubos de 5 mL. Proteger con papel aluminio, para proteger de la luz y conservar a -20 °C indefinidamente.

Solución 3: Suero de novillo bovino (BSS por sus siglas en inglés). Preparar 10 mL de BSS en tubos estériles de 13 mL y almacenarlos a -20 °C indefinidamente.

Solución 4: BSS/Heparina. Agregar 1000 unidades USP de heparina estéril (disolver en 3-5 mL de agua y esterilizar a través de un filtro de 0.20 µm utilizando una jeringuilla), agregar a 500 mL de BSS (Solución 3). Almacenar 10 mL en tubos estériles de 15 mL indefinidamente a -20 °C.

Solución 5: Estradiol. Disolver el estradiol de 1 a 3 mg en etanol para una concentración final de 1 mg/mL. Por ejemplo, si pesa 2.3 mg, adicione 2.3 mL de etanol (es más fácil ajustar el volumen que pequeñas masas). Almacenar en un envase de cristal a -20 °C por hasta 2 meses.

Solución 6: Folltropin. Reconstituir Folltropin-V según lo recomendado por el fabricante para preparar 20 µg/µL de solución. Poner 150 µL en tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenarlos indefinidamente a -20 °C.

Solución 7: Heparina. Disolver 20 mg en 10 mL de agua bidestilada. Medir con una pipeta las soluciones de 600 µL y almacenarlas a -20 °C en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL indefinidamente.

Solución 8: Gentamicina. Obtener solución de gentamicina (10 mg/mL) y almacenar a 4 °C hasta la fecha de expiración.

Solución 9: Mezcla de PHE. Prepare solución primaria de 1 mL de hipotaurina (1.09 mg en 10 mL de solución salina), 2 mL de penicilamina (3 mg en 10 mL de solución salina) y 250 µL de epinefrina (disolver 1.83 mg en 40 mL de una solución de Lactato-Metabisulfito) (Solución 9A). La epinefrina se oxida fácilmente, tener precaución de proteger el

procedimiento de la luz directa, cubrir con papel aluminio el envase o utilizar un envase oscuro. Combinar los 10 mL de hipotaurina, 10 mL de penicilamina y 4 mL de epinefrina, con 16 mL de solución salina y esterilice filtrando a 0.20 μm . Forme alícuotas de 400 μL de mezcla de PHE en tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 mL y almacene en un envase resistente y protegido de la luz (oscuro u opaco) a temperatura de -20 °C indefinidamente. Sobre la manipulación de la mezcla de PHE para su uso, cubra el tubo con papel aluminio mientras se utiliza.

Solución 9a: Solución Lactato-Metabisulfito. Agregar 77 μL de una solución de lactato de Sodio al 98% (o del volumen equivalente si se utiliza una solución con un porcentaje más bajo del lactato de Sodio) y 50 mg de Metabisulfito de Sodio a 50 mL de agua. Hacer para cada uso.

Solución 10A: Albumina Sérica Bovina Libre de Ácidos Grasos Esenciales (EFAF BSA por sus siglas en inglés) para SOF-FERT. Disolver EFAF BSA (Sigma) en Solución Base SOF a una concentración de 60 mg/mL, esterilizar por filtración a 0.20 μm . Almacenar en alícuotas de 10 mL en tubos de 13 mL y guardar a -20 °C indefinidamente.

Solución 10B: EFAF BSA para SOF-BE1. Disolver EFAF BSA (Sigma) en Solución Base SOF a una concentración de 40 mg/mL, esterilizar por filtración a 0.20 μm . Almacenar en alícuotas de 10 mL en tubos de 15 mL a -20 °C indefinidamente.

Solución 10C: Albumina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en inglés) Fracción V para H-SOF. Disolver BSA Fracción V (Sigma) en Solución Base SOF a una concentración de 60 mg/mL y esterilizar por filtración a 0.20 μm . Almacenar en alícuotas de 25 mL en tubos de 50 mL y guardar a -20 °C indefinidamente.

Solución 11: Glutamax. Disolver 0.434 g de ALA-Gln en 20 mL de agua sigma y esterilizar filtrando a 0.20 μm . Hacer alícuotas de 600 μL en tubos Eppendorf estériles y guardar a -20 °C indefinidamente.

Solución 12: MgCl_2 para Percoll. Prepare la solución de 0.1 M agregando 0.203 g de MgCl_2 a 10 mL de agua. Filtrar a 0.20 μm y almacenar estéril a 4 °C indefinidamente.

Solución 13: CaCl_2 para Percoll. Preparar la solución de 1 M agregando 0.735 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 5 mL de agua. Filtrar a 0.20 μm y almacenar estéril a 4 °C indefinidamente.

Solución 14: Hialuronidasa. Preparar la solución común de hialuronidasa tipo IV en 10.000 unidades/mL de solución salina, esterilizarla a través de un filtro de 0.20 μm en un tubo estéril, y almacenar 100 μL en tubos estériles de microcentrífuga a -20 °C indefinidamente.

Solución 15: 100X Mio-inositol. Disolver 0.998 g de mio-inositol en 20 mL de agua bidestilada. Esterilizar y filtrar a 0.20 μm , almacenar en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf de 1.5 mL, guardar a -20 °C indefinidamente.

Solución 16: 100X Citrato de Sodio. Disolver 0.2941 g de citrato de sodio en 20 mL de agua bidestilada. Esterilizar y filtrar a 0.20 μm , almacenar 1 mL en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -20 °C indefinidamente.

Solución 17 (opcional): 100X cafeína. Disolver 0.3883 g de cafeína en 20 mL de agua bidestilada. Esterilizar por filtración en 0.20 μm y hacer alícuotas de 1.2 mL en tubos estériles de microcentrífuga y almacenar a -20 °C indefinidamente.

Solución 18: Penicilina/Estreptomicina. Tomar directamente del frasco comercial de 100X Penicilina/Estreptomicina. Descongelar la botella de 100 mL. Haga soluciones de 10 mL en tubos estériles de 13 mL, consérvelos a -20 °C indefinidamente.

Anexo 2. Preparación de los medios para el protocolo SOF.

Solución salina para medio de transporte (0.9%):

Se disolvieron 9 g de NaCl en 1 L de agua bidestilada y se adicionaron 10 mL de la solución 100X de penicilina-estreptomicina y se almacenó a 4 °C.

Medio de Colección de Oocitos (MCO):

Se utilizó el medio TCM-199 SIGMA 7528. Se ajustó el pH a 7.2-7.4. El medio viene en envases de 400 mL. Un día antes de usar se adicionó con: 2.5 mL de 100X Glutamax (Solución 11). Se esterilizó y filtró usando filtros Nalgene 0.20 µm, se conservó a 4 °C y se rotuló con MCO y la fecha de preparación.

Un día antes de la colección de oocitos, se adicionó una alícuota de la Solución 4 (Suero de Novillo + Heparina) y una alícuota de la Solución 18 (penicilina-estreptomicina). Se marcaron MCO suplementado, fecha de elaboración y se utilizó en un plazo de una semana.

Medio de Maduración de Oocitos (MMO):

Se tomaron 88 mL del medio TCM-199 SIGMA 4530 y se ajustó el pH entre 7.2-7.3; se marcó el frasco con MMO suplementado, se colocó la fecha de elaboración y se almacenó a 4 °C.

El día del uso se preparó MMO + suplementos, se adicionaron los siguientes suplementos a una alícuota de 88 mL:

Fórmula para preparar MMO suplementado.

Ingrediente	Cantidad
Suero de Novillo Bovino (Solución 3)	10 mL
Gentamicina (Solución 8)	500 µL
Piruvato de Sodio (Solución 2)	1000 µL
Glutamax (Solución 11)	500 µL
Folltropin (Solución 6)	125 µL
Estradiol (Solución 5)	200 µL

Después que se adicionaron todos los suplementos, se marcó con MMO suplementado, se colocó la fecha de elaboración y se almacenó a 4 °C.

Solución base HEPES-SOF:

Para elaborar 20 L de solución base HEPES-SOF, se disolvieron los ingredientes listados a continuación en 18 L de agua estéril (Sigma W4502). Se ajustó el pH a 7.4-7.5 y se llevó el volumen hasta 20 L. Se esterilizó por filtración utilizando botes de 1 L y se colocaron 950 mL de la solución en cada bote. Se utilizaron filtros Nalgene 0.20 µm FastCap (número de

catálogo 298-9020). Se conservaron a 4 °C. Se usaron dos filtros por cada 10 L. Se marcaron con Solución Base HEPES-SOF y se colocó la fecha de preparación.

Fórmula para la preparación de la solución base HEPES-SOF.

Ingrediente	Concentración	Sigma catálogo #	Peso Molecular	Cantidad
HEPES [‡]	10.00 mM	H4034	238.30	47.660 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.17 mM	C7902	147.00	3.440 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.49 mM	M2393	203.31	1.992 g
KH ₂ PO ₄	1.19 mM	P5655	136.10	3.239 g
KCl	7.16 mM	P5405	74.55	10.676 g
NaCl	107.70 mM	S5886	58.44	125.880 g
NaHCO ₃	2.00 mM	S5761	84.01	3.360 g
Lactato de Sodio	5.30 mM	L4263	112.06	15.112 mL

[‡]HEPES: es una solución tampón, que permite mantener estable el pH (potencial hidrógeno) en un medio determinado

Preparación del HEPES-SOF:

Se adicionaron los ingredientes listados a continuación en 950 mL de solución base HEPES-SOF. Se marcó el frasco con la fecha de elaboración y se almacenó a 4 °C.

Fórmula para la preparación del HEPES-SOF.

Ingrediente	Cantidad
Albumina Sérica Bovina Fracción V (Solución 10C)	50.0 mL
Piruvato de Sodio (Solución 2)	10.0 mL
Gentamicina (Solución 8)	750.0 µL

Solución Base SOF:

Para preparar 2 L de la solución base SOF, se disolvieron los ingredientes listados a continuación en 1.8 L de agua estéril (Sigma W4502). Se ajustó el pH a 7.2-7.3 y se llevó el volumen hasta 2 L. Se esterilizó por filtración en frascos de 1 L usando filtros de 0.20 µm. Se hicieron alícuotas de 90 mL en botes de vidrio y se almacenaron a 4 °C. Se marcó con Solución Base SOF, se colocó la fecha de elaboración y de expiración.

Medio SOF-FERT:

Se adicionaron los ingredientes listados a continuación en 90 mL de Solución Base SOF. Se marcó el envase con SOF-FERT, se colocó la fecha de elaboración y expiración y se almacenó a 4 °C.

Fórmula para la preparación del medio SOF-FERT.

Suplemento	Cantidad
EFAF BSA [‡] (Solución 10A)	10 mL
Piruvato de Sodio (Solución 2)	1000 µL
Gentamicina (Solución 8)	50 µL
Heparina (Solución 7)	500 µL

[‡]EFAF BSA: Albúmina Sérica Bovina Libre de Ácidos Grasos Esenciales.

Fórmula para preparar la solución base SOF.

Ingrediente	Concentración	Sigma catálogo #	Peso Molecular	Cantidad
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.17 mM	C7902	147.00	0.3440 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.49 mM	M2393	203.31	0.1992 g
KH ₂ PO ₄	1.19 mM	P5655	136.10	0.3239 g
KCl	7.16 mM	P5405	74.55	1.0676 g
NaCl	107.70 mM	S5886	58.44	12.5880 g
NaHCO ₃	25.07 mM	S5761	84.01	4.2123 g
Lactato de Sodio	5.30 mM	L4263	112.06	15.11 µL

Medio SOF-BE1:

Se adicionaron los ingredientes listados a continuación en 90 mL de la Solución Base SOF. Se marcó el recipiente con SOF-BE1, se colocó la fecha de elaboración, expiración y se almacenó a 4 °C.

Fórmula para preparar el medio SOF-BE1.

Ingrediente	Cantidad
EFAF BSA [‡] (Solución 10B)	10 mL
Glutamax (Solución 11)	500 µL
Piruvato de Sodio (Solución 2)	2000 µL
Myo-inositol (Solución 15)	1000 µL
Citrato de Sodio (Solución 16)	1000 µL
Aminoácidos No Esenciales	1000 µL
Aminoácidos Esenciales	2000 µL
Gentamicina (Solución 8)	250 µL

[‡]EFAF BSA: Albumina Sérica Bovina Libre de Acidos Grasos Esenciales.

Preparación del medio 10X TL:

Se adicionaron los ingredientes listados a continuación en 100 mL de agua bidestilada. Se marcó el recipiente con 10X SP-TL, se colocó la fecha de elaboración, expiración y se almacenó a 4 °C.

Percoll 90%.

1. Se colocaron 4 mL de 10X SP-TL en un vaso volumétrico pequeño y se agregó 0.084 g de bicarbonato de sodio y 90 μ L de Lactato de Sodio (Solución 1).
2. Se mezcló hasta que el bicarbonato se disolvió.
3. Se agregaron 36 mL Percoll.
4. Se agregaron 158 μ g de $MgCl_2$ (Solución 12) y 78 μ g de $CaCl_2$ (Solución 13).
5. Mientras se mezclaban los ingredientes anteriores, se ajustó el pH a 7.3-7.45 y se filtró con un filtro de 0.20 μ m. Si se formó un precipitado en la solución de Percoll, se continuó revolviendo. Si los compuestos no se disolvieron, se recomenzó el proceso. Es muy fácil la precipitación si el ácido o la base se agregan rápidamente durante el ajuste del pH. Por lo tanto, se recomienda que este paso se ejecute lentamente.
6. Se almacenó a 4 °C.

Fórmula para la preparación del medio 10X SP-TL.

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Agua bidestilada	100 mL
NaCl	4.675 g
KCl	0.230 g
$NaH_2PO_4+H_2O$	0.400 g
HEPES	2.380 g

Se ajustó el pH a 7.3, se filtró para esterilizar y almacenó indefinidamente a 4 °C.

Anexo 3. Preparación de las soluciones stock para el protocolo Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALP).

Solución 1: Lactato de Sodio. Comprar a 98% (Sigma). Seguir las indicaciones del fabricante para la fecha de vencimiento. Almacenar a 4 °C.

Solución 2: Piruvato de Sodio. Disolver 0.220 g de piruvato de sodio en 100 mL de agua. Esterilizar, filtrar y envolver la botella de 100 ml en aluminio, para proteger de la luz; conservar a 4 °C por 1 mes.

Solución 3: Suero de novillo bovino (BSS por sus siglas en inglés) o Suero de Vaca en Celo (SVC). Preparar 10 mL de BSS en tubos estériles de 13 mL y almacenarlos a -20 °C indefinidamente.

Solución 4: BSS/Heparina. Agregar 1000 unidades USP de heparina estéril (disolver en 3-5 mL de agua y esterilizar a través de un filtro de 0.20 µm utilizando una jeringuilla), agregar a 500 mL de BSS (Solución 3). Almacenar 8 mL en tubos estériles de 13 mL indefinidamente a -20 °C.

Solución 5: Estradiol. Disolver el estradiol de 1 a 3 mg en etanol para una concentración final de 1 mg/mL. Almacenar en un envase de cristal a -20 °C por hasta 2 meses.

Solución 6: Folltropin. Reconstituir Folltropin-V según lo recomendado por el fabricante para preparar 20 µg/µL de solución. Poner 150 µL en tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenarlos indefinidamente a -20 °C.

Solución 7: Heparina. Disolver 20 mg en 10 mL de agua. Medir con una pipeta las soluciones de 300 µL y almacenarlas a -20 °C en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL indefinidamente.

Solución 8: Gentamicina. Diluir a 5 mg/mL de concentración, filtrar y esterilizar. Medir con una pipeta y poner de a 1 mL en tubos estériles de 4 mL y almacenarlos a -20 °C indefinidamente.

Solución 8A: Gentamicina. Al preparar la solución 8, preparar algunos tubos adicionales de solución de 10 µL en tubos estériles de microcentrífuga y almacenarlos a -20 °C indefinidamente.

Solución 9: Mezcla de PHE. Prepare solución primaria de 1 mL de hipotaurina (1.09 mg en 10 mL de solución salina), 2 mL de penicilamina (3 mg en 10 mL de solución salina) y 250 µL de epinefrina (disolver 1.83 mg en 40 mL de una solución de Lactato-Metabisulfito) (Solución 9A). La epinefrina se oxida fácilmente, tener precaución de proteger el procedimiento de la luz directa, cubrir con papel aluminio el envase o utilizar un envase oscuro. Combinar los 10 mL de hipotaurina, 10 mL de penicilamina y 4 mL de epinefrina, con 16 mL de solución salina y esterilice filtrando a 0.20 µm. Forme alícuotas de 400 µL de mezcla de PHE en tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 mL y almacene en un envase resistente y protegido de la luz (oscuro u opaco) a temperatura de -20 °C indefinidamente.

Sobre la manipulación de la mezcla de PHE para su uso, cubra el tubo con papel aluminio mientras se utiliza.

Solución 9A: Solución Lactato-Metabisulfito. Agregar 77 μL de una solución de lactato de sodio al 98% (o del volumen equivalente si se utiliza una solución con un porcentaje más bajo de lactato de sodio) y 50 mg de Metabisulfito de Sodio a 50 ml de agua. Hacer para cada uso.

Solución 10: Glutamina (1 mL). Preparar la solución común 1.5 g de glutamina/100 mL de agua, filtrar, esterilizar y hacer las soluciones de 1 mL en tubos estériles de 4 mL y almacenarlas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

Solución 11: Glutamina (4 mL). Preparar la solución común 1.5 g de glutamina/100 mL de agua, filtrar, esterilizar y almacenar 4 mL en tubos de 13 mL a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

Solución 12: MgCl_2 para Percoll. Prepare la solución de 0.1 M agregando 0.203 g de MgCl_2 a 10 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

Solución 13: CaCl_2 para Percoll. Preparar la solución de 1 M agregando 0.735 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 5 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

Solución 14: Hialuronidasa. Preparar la solución común de hialuronidasa tipo IV en 10.000 unidades/mL de solución salina, esterilizarla a través de un filtro de $0.20\text{ }\mu\text{m}$ en un tubo estéril, y almacenar 100 μL en tubos estériles de microcentrífuga a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

Solución 15: Penicilina/Estreptomicina (4 mL). Descongele la botella de 100 mL de Penicilina/Estreptomicina y forme soluciones de 4 mL en tubos estériles de 5 mL y almacénense a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

Solución 16: Penicilina/Estreptomicina (10 mL). Descongele la botella de 100 mL de Penicilina/Estreptomicina y haga soluciones de 10 mL en tubos estériles de 13 mL, consérvelos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

Soluciones 17-23 (para preparar los medios Tyrode's Lactato TL).

Solución 17: NaCl. Disolver 6.665 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución 18: KCl. Disolver 0.588 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril en $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución 19: NaHCO_3 . Disolver 1.052 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para una semana solamente.

Solución 20: PO_4 . Disolver 0.235 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución 21: 1 M HEPES. Agregar 119 g de HEPES a 400 mL de agua. Ajustar el pH a 7.0 y ajustar el volumen hasta 500 mL. En un envase estéril filtrar y cubrir con el papel de aluminio; almacenar a 4 °C indefinidamente.

Solución 22: CaCl₂ para TL. Disolver 1.470 g de CaCl₂ + 2H₂O en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estériles a 4 °C.

Solución 23: MgCl₂ para el TL. Disolver 1.017 g MgCl₂ + 6H₂O en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C.

Solución 24: Suero Fetal Bovino. Preparar soluciones de 100 µL de Suero Fetal Bovino inactivado por calor, en tubos estériles de microcentrífuga y almacenarlas a -20 °C.

Solución 25: Glutamax. Disolver 0.434 g de ALA-Gln en 20 mL de agua Sigma y esterilizar filtrando a 0.20 µm. Hacer alícuotas de 600 µl en tubos Eppendorf estériles y guardar a -20 °C indefinidamente.

Solución 26: Disolver 2 g de BSA fracción V (Sigma A9647) en 10 mL de agua bidestilada Sigma. Filtrar a 0.2 µm y hacer alícuotas de 800 µL en tubos Eppendorf estériles y almacenar a -20 °C indefinidamente.

Solución 27: MEM Vitaminas Sigma M6895. Preparar directamente del frasco alícuotas de 50 µL en tubos Eppendorf, almacenar a -20 °C indefinidamente.

Solución 28: Disolver Factor Epidermal de Crecimiento (EGF por sus siglas en inglés) Sigma (20 µL) en 9.6 mL de MMO y hacer alícuotas de 140 µL. almacenar a -20 °C indefinidamente.

Anexo 4. Preparación de los medios para el protocolo TALP.

Solución Salina de Transporte de ovarios (0.9%):

Solución salina al 0.9% (9 g NaCl por litro) en agua bidestilada. Se puso una etiqueta con: “Solución Salina al 0.9% y la fecha de elaboración”, se almacenó indefinidamente a 4 °C.

Medio de Colección de Ovocitos (MCO):

Se utilizó el medio TCM-199 SIGMA 7528 (almacenado a 4 °C) a un pH entre 7.2-7.4. Un día antes de usarlo se adicionó:

Una solución # 4: BSS+ Heparina, 1 solución # 11: glutamina (4 mL), y 1 solución # 15: Penicilina/Estreptomina (4 mL). Se cambió la etiqueta a MCO + suplementos, se puso la fecha y se utilizó en el plazo de una semana, almacenado a 4 °C.

Medio de Maduración de Oocitos (MMO):

Se preparó una solución de 87 mL de TCM-199 SIGMA 4530. Se almacenó a 4 °C hasta su uso. La noche antes de usarlo, se agregó lo siguiente:

Solución # 3: BSS.

Solución # 8: Gentamicina.

125 µL solución # 6: Folltropin.

200 µL solución # 5: Estradiol.

1 mL solución # 2: Piruvato de Sodio.

Solución # 25: Glutamax, se adicionaron 500 µL.

Solución # 28: EGF.

Se cambió la etiqueta a MMO suplementado, y fue almacenado a 4 °C. Se usó en un plazo de 1 semana.

Preparación del medio 10X SP-TL:

Para preparar la solución común de 10X SP-TL, se diluyó:

1. En 100 mL de agua:

NaCl - 4.675 g

KCl - 0.23 g

NaH₂PO₄+H₂O - 0.40 g

HEPES - 2.38 g

2. Se ajustó el pH a 7.3, se filtró para esterilizar y se almacenó indefinidamente a 4 °C.

Percoll 90%.

1. Se colocaron 4 mL de 10X SP-TL en un vaso volumétrico pequeño y se adicionaron 0.084 g de bicarbonato de sodio y 90 µL de Lactato de Sodio (Solución 1).

2. Se mezcló hasta que el bicarbonato se diluyó.

3. Se adicionaron 36 mL de Percoll.

4. Se adicionaron 158 µg de MgCl₂ (Solución 12) y 78 µg de CaCl₂ (Solución 13).
5. Mientras que se mezclaba, se ajustó el pH a 7.3-7.45 y se filtró, con filtro de 0.45 µm (en un tubo filtrante de 50 mL). En caso de que se formara un precipitado en la solución de Percoll, se continuaba revolviendo. Si los compuestos no se disolvían, entonces se recomenzaba el proceso. Era muy fácil la precipitación si el ácido o la base se añadían rápidamente durante el ajuste del pH. Por lo tanto, se recomienda que este paso se ejecute lentamente.

Soluciones de Tyrode's Lactato (TL) – para preparación de Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALPs).

1. Para preparar los medios, se mezclaron los ingredientes como se describe a continuación (todos los volúmenes estaban en mililitros), se ajustó el pH, se esterilizó por filtración en 0.20 µm. Se escribió la fecha de preparación y vencimiento en la etiqueta (se usó en un plazo de una semana) y se almacenó a 4 °C.

Formulación para la preparación de las soluciones del TALP.

Ingrediente	SP-TL	HEPES-TALP	IVF-TALP
Agua (mL)	79.232	177.0	40.157
Solución 17: NaCl (mL)	4.34	10.0	2.5
Solución 18: KCl (mL)	1.96	4.0	1.0
Solución 19: NaHCO ₃ (mL)	10.00	1.6	5.0
Solución 20: PO ₄ (mL)	1.0	2.0	0.50
Solución 1: NaC ₃ H ₅ O ₃ (mL)	0.368	0.372	0.093
Solución 21: HEPES (mL)	1.0	2.0	0
Solución 22: CaCl ₂ (mL)	1.0	2.0	0.50
Solución 23: MgCl ₂ (mL)	1.10	1.0	0.25
pH	7.4	7.3	7.4
Osmolaridad (mOsm)	295-305	275-285	290-300

Medio de Cultivo SOF:

Medio SOF:

Stock A: Se filtró a 0.20 µm. Almacenar máximo por 2 meses y conservar a 4 °C.

Producto	Referencia	Cantidad
H ₂ O	W1503	45 mL
NaCl	S5886	3.145 g
KCl	P5405	0.267 g
KH ₂ PO ₄	P5655	0.081 g
MgSO ₄	M2643	0.091 g
Lactato de Sodio	L4263	0.30 mL

Stock B: No se filtró. Se prepara cada semana.

Producto	Referencia Sigma	Cantidad
H ₂ O	W1503	50 mL
NaHCO ₃	S5761	1.050 g
Rojo de Fenol	P0209	200 µL

Stock C: No se filtró. Se preparará cada semana.

Producto	Referencia Sigma	Cantidad
H ₂ O	W1503	50 mL
Piruvato de Sodio	P3662	0.400 g

Stock D: Se filtró a 0.20 µm. Se utilizaron en 2 meses. Se conservaron a 4 °C.

Producto	Referencia	Cantidad
H ₂ O	W1503	50 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	C7902	1.310 g

Continuación Medio de Cultivo:

SOF: Se hizo cada semana. Se comprobó la presión osmótica, que tenía que oscilar entre 270-285 mOsm. Se filtró a 0.20 µm y se conservó a 4 °C.

Producto	Referencia Sigma	Cantidad
H ₂ O	W1503	39 mL
Sodio tri-citrato	S4641	0.005 g
Mio-inositol	I7508	0.025g
Stock A		5 mL
Stock B		5 mL
Stock C		0.5 mL
Stock D		0.5 mL
BME [‡]	B6766	1.5 mL
MEM [¥]	M7145	0.5 mL
Glutamina	G6392	50 µL
Gentamicina	G1272	0.250 mL
MEM Vitaminas [§]	M6895	50 µL

[‡]BME: Aminoácidos Esenciales

[¥]MEM: Aminoácidos No Esenciales

[§]MEM Vitaminas: Aminoácidos No Esenciales más vitaminas.

Medios TALP (Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato).

Para preparar los medios, se diluyeron los ingredientes como se describe a continuación. Se esterilizó por filtración en 0.20 μm . Se rotuló la fecha de vencimiento en la etiqueta (se usó en un plazo de una semana), y se almacenó a 4 °C.

Formulación para los medios de TALP.

Ingrediente	SP-TALP	HEPES-TALP	IVF-TALP
TL (mL)	38.0	100.0	50.0
BSA, Fracción V [‡] (mg)	240	300	0
EFAF BSA (mg) [‡]	0	0	300
Solución 2: piruvato (mL)	2.0	1.0	0.5
Solución 8: gentamicina (μL)	80	150	50
Solución 7: heparina (μL)	0	0	250

[‡]BSA: Albúmina Sérica Bovina

[‡]EFAF BSA: Albúmina Sérica Bovina Libre de Ácidos Grasos Esenciales.

Medio de cultivo: Se filtró a 0.20 μm .

Producto	Referencia Sigma	Cantidad
SOF		10 mL
BSA [‡]	A8806	0.040 g
ITS [‡]	I 3146	50 μL

[‡]BSA: Albumina Sérica Bovina

[‡]ITS: Insulina Transferrina Selenio.