

**Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de  
los oocitos bovinos sobre el porcentaje de  
blastocistos obtenidos en el Laboratorio de  
Reproducción Animal de Zamorano**

**Sara Virginia Diaz Flores**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Noviembre, 2017

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de  
los oocitos bovinos sobre el porcentaje de  
blastocistos obtenidos en el Laboratorio de  
Reproducción Animal de Zamorano**

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

Presentado por

**Sara Virginia Diaz Flores**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2017

## **Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de los oocitos bovinos sobre el porcentaje de blastocistos obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano**

**Sara Virginia Diaz Flores**

**Resumen.** Para aumentar el porcentaje de embriones transferibles y de excelente calidad es necesario evaluar los tiempos de maduración. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del tiempo de maduración *in vitro* sobre el porcentaje de embriones obtenidos a los siete días de cultivo *in vitro* en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Se recolectaron 23 ovarios del matadero, utilizando la técnica de aspiración folicular se obtuvieron 65 oocitos viables (citoplasma homogéneo y varias capas de células *cumulus oophorus*) para un promedio de 2.83 oocitos por ovario. El porcentaje de maduración no presentó diferencias ( $P>0.05$ ) con un 73.53% a las 18 horas y 74.19% a las 24 horas. La fertilización fue de 76% y 60.87% para las 18 y 24 horas de maduración respectivamente utilizando el protocolo Tyrode's Albumina Lactato Piruvato (TALP). Los embriones se cultivaron en medio Fluido Sintético del Oviducto (SOF) obteniendo 57.89% de clivaje y 42.11% de apoptosis evaluados al tercer día del cultivo. La eficiencia final se evaluó con respecto a los oocitos en clivaje siendo 63.44% para los oocitos madurados a las 18 horas y 50% a las 24 horas. El diámetro, perímetro y área del macizo celular interno, diámetro externo y grosor de la zona pelúcida de los oocitos no presentaron diferencias ( $P>0.05$ ) para los dos tiempos de maduración. Los tiempos de maduración de 18 y 24 horas no afectaron el porcentaje de embriones obtenidos a los siete días de cultivo.

**Palabras clave:** Apoptosis, clivaje, *cumulus oophorus*, embriones.

**Abstract.** To increase the percentages of transferable embryos and obtain embryos of excellent quality it is necessary to evaluate maturation time. The objective of this study was to determine the effect of maturation time *in vitro* over the percentage of embryos obtained at seven days of *in vitro* at the Reproduction Laboratory of Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Using the follicular aspiration technique, 23 ovaries were recollected from a slaughterhouse, obtaining only 65 viable (homogenous cytoplasm and various layers of *cumulus oophorus*) for an average of 2.83 oocytes per ovary. No difference ( $P>0.05$ ) was found of maturation with a percentage of 73.53% at 18 hours and 74.19% at 24 hours. The Percentage of fertilization was of 76% and 60.87% for 18 and 24 hours of maturation respectively using Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate protocol (TALP). The embryos were cultivated in a Synthetic Fluid of the Oviduct media (SOF) obtaining 57.89% of cleavage and 42.11% of apoptosis evaluated the third day of cultivation. The final efficiency was evaluated in respect to the oocytes in cleavage being 63.44% for matured oocytes at 18 hours and 50% at 24 hours. The diameter, perimeter, and area of the internal cellular clump, external diameter and thickness of the pellucid of the oocytes did not represented differences ( $P>0.05$ ) for both maturation times. The maturation time being 18 and 24 hours did not affect the percentage of embryos obtained at seven days of cultivation.

**Key words:** Apoptosis, cleavage, *cumulus oophorus*, embryos.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>14</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>16</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>18</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Porcentaje de maduración y fecundación <i>in vitro</i> de oocitos bovinos madurados a 18 y 24 horas.....	10
2. Porcentaje de clivaje y apoptosis de oocitos bovinos madurados a 18 y 24 horas...	11
3. Porcentaje de embriones obtenidos en relación a los oocitos madurados, fecundados y en clivaje .....	12
4. Diámetro, área y perímetro del Macizo Celular Interno (MCI) de oocitos bovinos pos fecundación .....	13
5. Diámetro externo y grosor de la zona pelúcida de oocitos bovinos pos fecundación .....	13

Figuras	Página
1. Oocitos recolectados. A) Oocitos viables. B) Oocitos degenerados .....	7
2. A) Oocitos madurados a las 18 horas. B) Oocitos madurados a las 24 horas. C) Oocitos degenerados.....	8
3. Oocitos con 20 horas en el medio de fertilización. A) Oocitos no fertilizados. B) Oocitos fertilizados.....	9
4. Oocitos al séptimo día en el medio cultivo SOF. A) embriones obtenidos. B) Oocitos en apoptosis.....	11
5. Oocitos post fecundación medidos con el programa Dinocapture 2.0 .....	12

Anexos	Página
6. Preparación de las soluciones madre (soluciones stock).....	18
7. Preparación de las soluciones de trabajo .....	20

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones es una técnica utilizada en el laboratorio para la obtención de embriones con fines comerciales o científicos. Dentro de esta técnica se encuentra la maduración, fecundación y cultivo embrionario *in vitro* (Urribarri *et al.* 2012). La obtención de ovarios de vacas faenadas es el método más común y de bajo costo. Esta técnica es la que dio origen a la producción *in vitro* de embriones bovinos y su producción a gran escala (Palma 2008). Para que la producción *in vitro* de embriones sea exitosa y con impacto real en la producción bovina, se deben mejorar una serie de dificultades que se presentan en la calidad de ovocitos obtenidos. Estas dificultades están más relacionadas con los medios de cultivo que se utilizan y el potencial de desarrollo de los embriones (Urribarri *et al.* 2012).

La clasificación de los ovocitos es una etapa crítica en el proceso de la producción *in vitro* de los embriones ya que desde el comienzo se debe contar con material de buena calidad. Dentro de los aspectos más importantes para determinar la capacidad de maduración embrionaria se encuentra el estado nuclear, características citoplasmáticas, la corona radiata, las células del *cumulus oophorus* y el diámetro de los ovocitos (Martínez 2013). Pero el método más utilizado para diferenciar los oocitos competentes de los que no lo son es la morfología y constitución del *cumulus oophorus*, como, por ejemplo, que esté compacto y de un color gris o marrón oscuro uniforme. El tamaño de éste está relacionado con el tamaño del folículo, a mayor tamaño mayor número de capas.

Para promover el desarrollo y capacitación del oocito durante el cultivo *in vitro* es necesaria la comunicación óptima entre el oocito y las células del *cumulus oophorus* para una mejor fecundación (Palma 2008), también es un indicador de mayores porcentajes en la maduración de los oocitos (De los Reyes 1994). Estructuralmente está constituido por grupos de células de la granulosa que se ubican alrededor del ovocito, que aportan nutrientes al mismo durante la etapa de crecimiento. También contribuye en la formación de la zona pelúcida y sintetizan proteínas que participan en el transporte del ovocito a través del oviducto y atrapan al espermatozoide para la fertilización (Martínez 2013).

La maduración de los ovocitos es necesaria, ya que está ligada con el éxito en la obtención de embriones. La cual inicia con la onda preovulatoria para progresar de profase I a metafase II en las 20 a 24 horas siguientes en producción *in vivo*. En cambio, de manera *in vitro* la meiosis ocurre de manera espontánea al momento de separar el oocito del folículo no ovulatorio y alcanzando la metafase II entre 18 y 24 horas después. Como manifestación que la maduración nuclear ha terminado con el final de la meiosis se encuentra la presencia del primer corpúsculo polar (Palma 2008).

Durante muchos años se han realizado estudios sobre los factores que favorecen a la maduración *in vitro*, como los suplementos hormonales o compuestos séricos. En las primeras investigaciones se utilizaron hormonas gonadotropinas (LH y FSH) y algunas hormonas esteroideas. Estas hormonas juegan un papel importante en el desarrollo del folículo y maduración del ovocito. Existen diferentes medios de maduración, los más utilizados son el M-199, TALP, MEM, HAM F-10 y F12 que brindan a los oocitos los requerimientos necesarios. Otro punto clave en la maduración de oocitos son las condiciones fisicoquímicas del medio, especialmente la temperatura, tiempo de duración del cultivo, pH y atmósfera gaseosa (Lorenzo 1992). La temperatura adecuada para gametos bovinos es de 38-39 °C por ser la temperatura corporal del animal y presentar mejores resultados en los porcentajes de fecundación (Gallegos 1998).

La fecundación *in vitro* también conocida como inseminación es cuando los oocitos maduros son cultivados con los espermatozoides (co-cultivo) para que de esa manera se fecunden (Palma 2008). Aquí se establece la interacción de los gametos mediante receptores, como, por ejemplo, proteínas que se han identificado en la zona pelúcida que permiten la unión. También los espermatozoides por si solos tienen receptores que permiten la unión a la zona pelúcida (De los Reyes 1994). Para tener una fecundación exitosa las células espermáticas deben ser sometidas a un proceso de preparación *in vitro* y de esta manera iniciar la capacitación y desencadenar la reacción acrosómica. Todo este proceso se realiza en el acrosoma que se origina en la espermátide del aparato de Golgi. El acrosoma es importante por las enzimas que la célula espermática ya activada necesita para atravesar las cubiertas celulares del oocito (Palma 2008).

Para el cultivo *in vitro* de embriones se han realizados muchas investigaciones con el fin de alcanzar altas tasas de blastocistos transferibles. El interés se fija principalmente en elaborar medios de cultivo que cumplan con todas las necesidades metabólicas de los embriones durante su desarrollo. Para esto es necesario conocer los requerimientos bioquímicos y el funcionamiento metabólico de los embriones hasta llegar al estadio de blastocisto. Se han hecho muchas modificaciones, principalmente para simplificar los mismos eliminando componentes innecesarios. Pero la calidad de los blastocistos, al finalizar el cultivo de los embriones no solo se debe al medio de cultivo sino también a la calidad intrínseca de oocitos. Los medios SOF, KSOM y CR-1 son los más utilizados para el cultivo *in vitro*. Estos por lo general contienen en su formulación iones, azúcares y aminoácidos tratando de simular lo más parecido posible el ambiente uterino y oviductal de la hembra, aunque esta tenga una composición más compleja (Palma 2008).

Con base en lo anterior, se desarrolló esta investigación que tuvo como objetivos evaluar el efecto del tiempo de Maduración *in vitro* (MIV) sobre el porcentaje de embriones obtenidos a los siete días de Cultivo *in vitro* (CIV), determinar los porcentajes de MIV (por expansión del *cumulus oophorus*) para cada uno de los tiempos en estudio, determinar los porcentajes de Fertilización *in vitro* (FIV); (por expulsión del segundo corpúsculo polar y presencia de dos células), determinar el porcentaje de clivaje y apoptosis y determinar el porcentaje de embriones (mórulas y blastocistos) obtenidos a los ocho días de CIV para cada uno de los tratamientos, además comparar el diámetro, perímetro y área del macizo celular interno, diámetro externo y grosor de la zona pelúcida de los oocitos de los dos tratamientos.

## 2. METODOLOGÍA

La investigación se realizó entre julio y agosto del 2017 en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal ubicadas en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Se utilizaron ovarios provenientes de vacas sacrificadas en el matadero de la empresa EMPASA localizada en el Valle del Yeguaré a 5 km de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se utilizó el protocolo de fertilización *in vitro* descrito por Hansen (2013) de la Universidad de Florida y adaptado por los autores, utilizando el sistema Tyrode's Albumina Lactato Piruvato (TALP) (Anexos 1 y 2).

### **Preparación de medios (Día -2)**

Preparación del medio de transporte, medio de colección de oocitos (MCO) y el medio de maduración de oocitos (MMO) y posteriormente se prepararon las placas de maduración (Placas Petri de 35 mm de diámetro con 15 microgotas), preparando microgotas flotantes de 50  $\mu$ L con MMO para colocar 10 oocitos por microgota, se cubrieron con aceite mineral y se dejaron gasificando en la incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> y 38.5 °C durante toda la noche.

### **Lavado de los ovarios (Día -1)**

Se recolectaron 23 ovarios en el matadero, tan pronto se sacrificaba la hembra se iban depositando en el medio de transporte que estaba a 25 °C. Al llegar los ovarios al laboratorio se eliminó todo el tejido sobrante y se lavaron tres veces en solución salina con antibiótico para retirar los restos de sangre.

Se preparó con anticipación un tubo de policarbonato de 50 mL con 5 mL de Medio de Colección de Oocitos (MCO), y se llevó al baño María a 38 °C; de igual manera se dejó preparada la pistola de transferencia Drummond, una placa de búsqueda con 5 mL de MCO y una placa Petri X con MCO en los cuatro compartimientos y el estereoscopio y la cámara de flujo laminar se desinfectaron con etanol al 70%, además se calibró la temperatura del estereoscopio y la platina de trabajo a 38.5 °C

### **Recolección de los oocitos (Día -1)**

Para la aspiración folicular se utilizaron jeringas de 5 mL de dos piezas y agujas calibre 18G × 1 ½ pulgada. El fluido aspirado se colocó suavemente en el tubo de policarbonato de 50 mL; una vez se terminó de aspirar todos los ovarios se dejaron decantar los tubos por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta de precisión, teniendo cuidado de no crear disturbios en el fondo ya que se pueden perder posibles oocitos. El precipitado del tubo se vació en un filtro de 50 µm y enjuagado el tubo y el filtro con MCO, inmediatamente el precipitado que queda en el filtro se lavó en la placa de búsqueda, lavando el filtro en forma invertida por tres veces con MCO.

### **Maduración *in vitro* (MIV) (Día -1)**

Se extrajeron 78 oocitos de los cuales solamente clasificaron 65 porque se encontró en ellos un mínimo de tres líneas de células del *cumulus oophorus* rodeando el oocito, citoplasma homogéneo y zona pelúcida intacta. Se transfirieron a uno de los pozos de la placa Petri X con MCO y se lavaron en los tres pozos restantes. Por último, se transfirieron a las microgotas que se encuentran en la incubadora en grupos de 10 oocitos/microgota y colocados a madurar por 18 horas 34 oocitos y por 24 horas 31 oocitos.

### **Fertilización *in vitro* (FIV) (Día 0)**

Todo el material se preparó tres horas antes de comenzar la fertilización.

- Se prepararon los medios IVF-TL, HEPES-TALP, Sp-TALP, la solución de Percoll al 90% y el medio de cultivo SOF.
- Se colocaron 5 mL del medio IVF-TL en un tubo de 15 mL de policarbonato sin cerrar la tapa y se llevó a la incubadora para equilibrarlo.
- En tres tubos de policarbonato de 10 mL se colocó HEPES-TALP en cada uno y se llevaron a la estufa a 38 °C.
- En un tubo de 15 mL se colocaron 10 mL de Sp-TALP y se llevó a la estufa a 38 °C.
- Se preparó la placa de fertilización utilizando placas Nunc de cuatro pozos adicionando 600 µL de IVF-TALP por pozo y se colocaron en la incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> y 38.5 °C.

Preparación del gradiente de Percoll:

- Se agregó 1.5 mL de Percoll al 90% en un tubo cónico de 15 mL y 1.5 mL de Sp-TALP, de esta forma se obtuvo el Percoll al 45%.
- En otro tubo cónico se depositaron 3 mL de Percoll al 90%.
- Se colocaron ambos tubos en la incubadora por dos horas.
- Se retiraron las dos soluciones de la incubadora y con una pipeta de precisión se depositó lentamente en el fondo del tubo del Percoll 45% los 3 mL del Percoll al 90%. De manera que se observara el menisco que se forma entre los dos gradientes y se llevó a la incubadora por una hora.

## **Procedimiento.**

Se descongeló una alícuota de PHE (solución 9) y se colocó en el baño maría a 38 °C por cinco minutos cubierta con un papel aluminio. Se preparó una placa Petri X adicionando 5 mL de HEPES-TALP en cada pozo y luego se colocó sobre la platina térmica. Se descongelaron tres pajuelas de semen de toros diferentes, utilizando agua a 37 °C por 45 segundos. Las pajuelas se secaron correctamente; la pistola y las tijeras se desinfectaron con alcohol al 70% el día anterior. Se armó la pistola de inseminación y se depositó el semen suavemente sobre las paredes del tubo que contiene los gradientes de Percoll 45-90%. Se realizó la centrifugación a 3300 RPM por 10 minutos.

Simultáneamente, se sacaron las placas de maduración de la incubadora con los oocitos y se transfirieron rápidamente los oocitos a la placa Petri X que contiene HEPES-TALP que se encontraba en la platina térmica, se lavó cada grupo de oocitos cuatro veces. Posteriormente se observaron en el microscopio y se depositaron en la placa de fertilización que se encontraba en la incubadora (IVF-TALP) dividiendo en dos pozos los oocitos madurados a las 18 horas y los otros dos pozos los oocitos madurados a 24 horas.

Después de centrifugar por 10 minutos, se extrajo el pellet del fondo del tubo con una pipeta de precisión y se depositó en el tubo cónico con 10 mL de Sp-TALP. Se centrifugó a 1500 RPM por cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante sin perturbar el fondo del tubo cónico y se agregaron 600 µL de IVF-TALP del tubo con 5 mL que se encontraba en la incubadora. Se calculó una dosis inseminante de 250 µL por pozo (aproximadamente  $3 \times 10^6$  espermias). Previo a la fertilización el semen fue evaluado en el microscopio de contraste de fase para determinar la motilidad individual la cual fue superior al 90%. Se completó la dilución con 80 µL de PHE por pozo y se llevó a la incubadora por 20 horas.

## **Cultivo *in vitro* (CIV) (Día 1)**

Después de las 20 horas en las placas de fertilización *in vitro*, se colocó una placa Petri X en la platina térmica con 5 mL de HEPES-TALP en cada pozo. Luego se colocaron dos alícuotas de 100 µL de hialuronidasa (solución 14) en el baño maría a 38° C; una vez descongeladas y atemperadas se agregaron 900 µL de HEPES-TALP en cada alícuota. Se depositaron en las alícuotas los presuntos oocitos putativos, se precipitaron y se retiró el sobrenadante para evitar que en la agitación los oocitos se peguen en la tapa del tubo eppendorf luego se agitó el tubo en el vórtex por 5 minutos. Posteriormente se depositaron en un pozo de la placa X, se lavó el tubo eppendorf con HEPES-TALP tres veces y se procedió a seleccionar los oocitos y lavarlos tres veces en los pozos restantes.

Se encontraron 19 cigotos putativos (presuntos cigotos que se formaron producto de la fertilización) en el tratamiento de 18 horas y 14 cigotos putativos en el tratamiento de 24 horas. Para el medio de cultivo se usó una placa Nunc de cuatro pozos, en los cuales se colocó una microgota flotante de 50 µL del medio SOF cubiertas con aceite mineral en cada pozo. Luego en dos pozos se colocaron 19 cigotos del tratamiento de 18 horas y en los otros dos pozos se colocaron 14 cigotos putativos del tratamiento de 24 horas.

Se evaluó el porcentaje de clivaje y apoptosis al tercer día del cultivo y el porcentaje de blastocistos y mórulas a los siete días. Al día cinco de cultivo se adicionó 5  $\mu$ L de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado con calor (solución 24). Para esta labor se colocó la platina térmica a 38 °C al igual que el suero fetal bovino, de tal manera que la labor se realizara lo más rápido posible. Se aplicaron dos tratamientos con base en el tiempo de maduración *in vitro*: 18 y 24 horas. Las unidades experimentales fueron los oocitos, tomando 34 oocitos para el tratamiento de 18 horas y 31 para el de 24 horas, para un total de 65 oocitos.

Se midieron las siguientes variables para cada uno de los tratamientos:

- Porcentaje de maduración *in vitro*
- Porcentaje de fertilización *in vitro*
- Porcentaje de clivaje (división celular)
- Porcentaje de apoptosis (muerte celular)
- Porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos)
- Diámetro, perímetro y área del macizo celular interno, diámetro externo y grosor de la zona pelúcida de los oocitos post fecundación.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (tiempos de maduración *in vitro* de 18 o 24 horas) y 34 repeticiones para el tratamiento de 18 horas y 31 para el de 24 horas. Para el análisis de los datos porcentuales se utilizó la prueba de distribución de frecuencias Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y para las variables numéricas se utilizó el modelo lineal general (GLM por sus siglas en inglés) y ANDEVA, aplicando el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS<sup>®</sup> 2012) 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 aspiración folicular. Se clasificaron como aptos o viables aquellos oocitos que estaban rodeados completamente con células del *cumulus oophorus*, con citoplasma homogéneo y compacto y zona pelúcida intacta. Se consideraron como degenerados aquellos oocitos con ausencia de las células del *cumulus oophorus* (Figura 1).

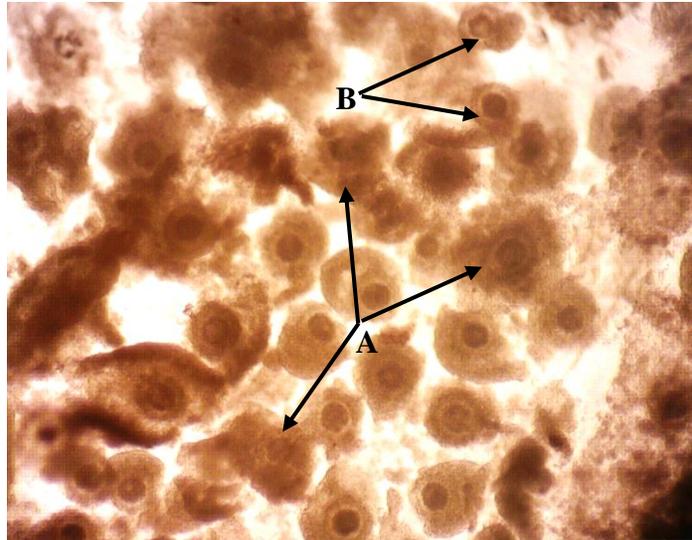


Figura 1. Oocitos recolectados. A) Oocitos viables. B) Oocitos degenerados.

De los 23 ovarios recolectados se obtuvieron 78 oocitos, de los cuales 13 oocitos (17.33%) se clasificaron como degenerados y 65 oocitos (86.67%) como viables, obteniendo un promedio de 2.83 oocitos viables por ovario. Resultados menores fueron encontrados por González *et al.* (1992) quienes hicieron un estudio en el que extrajeron 385 oocitos de 100 ovarios, de los cuales 156 oocitos (48.3%) fueron viables, obteniendo un promedio de 1.56 oocitos viables por ovario utilizando la técnica de aspiración folicular.

Hernández *et al.* (2010) reportaron que el número de oocitos viables por ovario varía en un rango de 2.1 a 4.3 también utilizando la técnica de aspiración folicular. La diferencia en la cantidad de oocitos viables por ovario se debe a la condición corporal y nutricional de la hembra (Palma 2008), y la experiencia del operador también representa un factor que

determina el número de folículos aspirados, de oocitos recuperados y el desarrollo posterior de embriones (Caicedo 2008).

### Porcentaje de maduración.

Los oocitos que se categorizaron como maduros fueron aquellos que tenían un *cumulus oophorus* expandido y denso, cubriendo todo el oocito y con un citoplasma uniforme y denso (Figura 2). Para el tratamiento de 18 horas se colocaron a madurar 34 oocitos viables de los cuales se clasificaron 25 (73.53%) como oocitos maduros y nueve (26.47%) como inmaduros. Para el tratamiento de 24 horas se colocaron a madurar 31 oocitos viables de los cuales se clasificaron 23 (74.19%) como oocitos maduros y ocho (25.81%) como inmaduros. Los porcentajes obtenidos no presentaron diferencias ( $P>0.05$ ) para 18 y 24 horas (Cuadro 1).

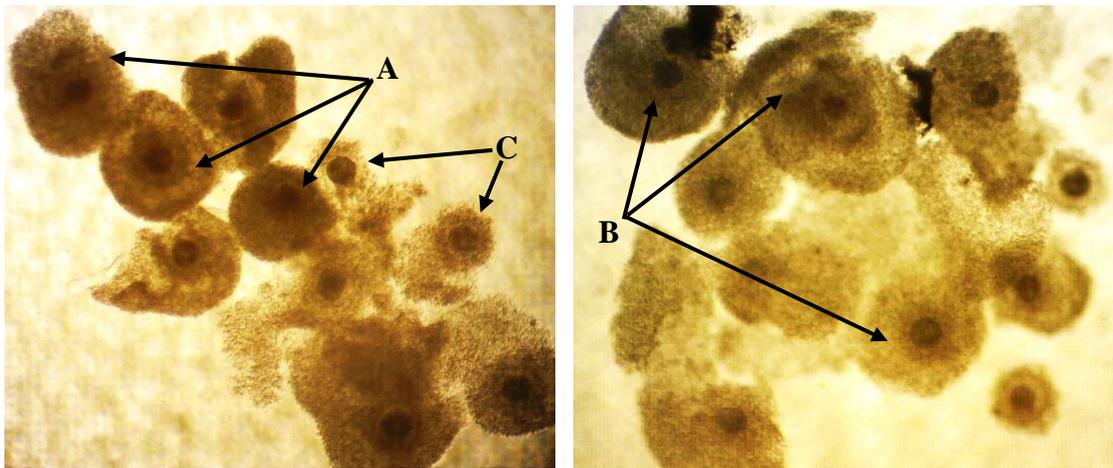


Figura 2. A) Oocitos madurados a las 18 horas. B) Oocitos madurados a las 24 horas. C) Oocitos degenerados.

En un estudio realizado por Aponte *et al.* (2010) en donde evaluaron la tasa de maduración de oocitos bovinos madurados *in vitro* a  $\leq 24$  horas y  $> 24$  horas, obtuvieron 59.49% de oocitos maduros en el tratamiento de  $\leq 24$  horas y 72% de oocitos maduros en el tratamiento de  $> 24$  horas. Estos autores encontraron diferencias significativas ( $P<0.05$ ), esto no concuerda con los datos obtenidos en esta investigación posiblemente por las horas tomadas para el tratamiento ya que ellos encontraron un porcentaje de maduración mayor a las 24 horas y en este estudio solo se compararon los resultados en 18 horas y 24 horas puntualmente.

### Porcentaje de fertilización.

Los oocitos que se categorizaron como fertilizados fueron aquellos que presentaban un citoplasma homogéneo y compacto, la presencia del espacio perivitelino y el segundo

corpúsculo polar. Sin embargo, los que no se fertilizaron presentaron un citoplasma con un aspecto granuloso (Figura 3). Para el tratamiento de 18 horas se colocaron 25 oocitos madurados a fertilizar, se obtuvo un porcentaje de fertilización de 76% (19 oocitos) y un porcentaje de no fertilizados de 24% (seis oocitos). Para el tratamiento de 24 horas se colocaron 23 oocitos madurados a fertilizar, obteniendo un porcentaje de fertilización de 60.87% (14 oocitos) y un porcentaje de no fertilizados de 39.13% (nueve oocitos). Los porcentajes obtenidos no presentaron diferencias ( $P>0.05$ ) para 18 y 24 horas (Cuadro 1).

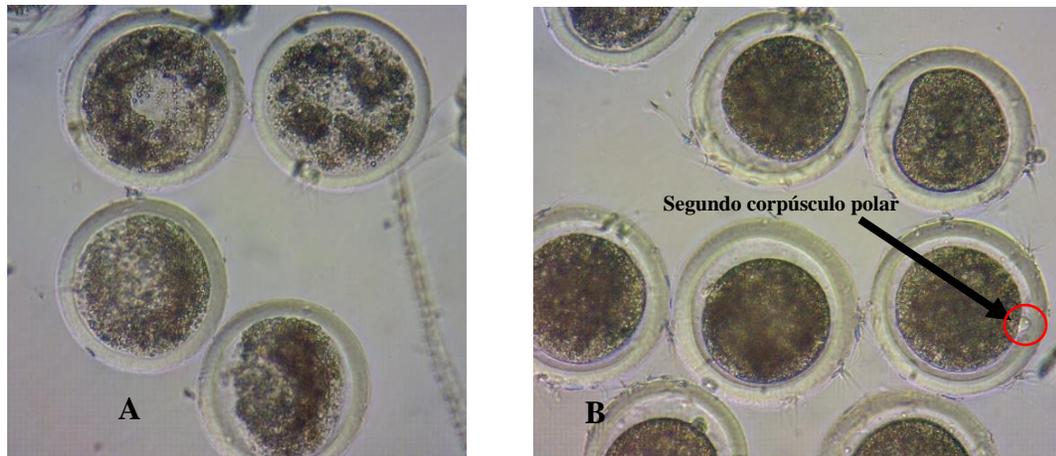


Figura 3. Oocitos con 20 horas en el medio de fertilización. A) Oocitos no fertilizados. B) Oocitos fertilizados.

Datos similares fueron encontrados por Fernández *et al.* (2007) quienes determinaron que el éxito de la fertilización *in vitro* radica en la capacitación espermática, en la maduración de los oocitos y de la fertilización *per se*. Hicieron un estudio de tres ensayos evaluando las tasas de fertilización. Colocaron 168 oocitos a fertilizar en el primer ensayo, 186 oocitos en el segundo ensayo y 190 en el tercer ensayo haciendo un total de 544 oocitos. Obtuvieron 71.4%, 72.0% y 76.3% de oocitos fertilizados respectivamente, dando esto un promedio total de 73.3% de oocitos fertilizados de los 544 oocitos puestos a fertilizar.

Cuadro 1. Porcentaje de maduración y fecundación *in vitro* de oocitos bovinos madurados a 18 y 24 horas.

Tiempo de maduración	Oocitos en maduración (n)	Maduración (%) (ns)	Oocitos en fertilización (n)	Fertilización (%) (ns)
18 horas	34	73.53	25	76.00
24 horas	31	74.19	23	60.70
Probabilidad		0.9515		0.2586

ns: no significativo

n: número

### Porcentaje de clivaje y apoptosis.

El clivaje es la división celular, la apoptosis es la muerte celular programada y es cuando pierden la competencia o capacidad de seguirse dividiendo. En promedio se calcula que un 60 a 70% de los oocitos madurados en el laboratorio de forma *in vitro* se pierden. Debido a que después de la fertilización el presunto cigoto es incapaz de llevar el clivaje de manera exitosa y se bloquea antes de alcanzar estadio de blastocisto. Este detenimiento en el desarrollo de los embriones producidos *in vitro* ocurre en un estadio diferente para cada especie, para los bovinos ocurre durante el cuarto ciclo celular, o sea en la división de ocho a 16 células (Tarazona *et al.* 2010).

El porcentaje de clivaje y apoptosis se tomó al tercer día del cultivo. Para el tratamiento de 18 horas se obtuvo un porcentaje de división celular embrionaria (clivaje) de 57.89% (11 oocitos) y un porcentaje de apoptosis de 42.11% (ocho oocitos). Con el tratamiento de 24 horas se obtuvo un porcentaje de clivaje del 71.43% (10 oocitos) y un porcentaje de apoptosis de 28.57%. No se encontraron diferencias ( $P>0.05$ ) para apoptosis y clivaje para 18 y 24 horas (Cuadro 2).

Datos menores fueron reportados por Quintanilla *et al.* (2015) en donde evaluaron a las 72 horas pos fecundación la tasa de división, obteniendo porcentajes de ovocitos divididos de 43.6% y 46.0% utilizando semen de un solo toro para la fertilización. Una de las posibles razones es porque en este estudio se utilizó semen de tres toros diferentes para potencializar su viabilidad ya que se ha determinado que no todos los toros producen semen que califica para utilizarlo en fertilización *in vitro*. En cambio Ward *et al.* (2002) en su estudio utilizaron semen de seis toros diferentes con fecundidad conocida *in vivo* e *in vitro*. Ellos reportaron porcentajes de clivaje mayores, con un 73.5% para oocitos madurados a las 16 horas y en oocitos madurados a 24 horas un porcentaje de clivaje de 85.7%.

Cuadro 2. Porcentaje de clivaje y apoptosis de oocitos bovinos madurados a 18 y 24 horas

Tiempo de maduración	Oocitos fecundados (n)	Clivaje (ns)	Apoptosis (ns)
18 horas	19	57.89	42.11
24 horas	14	71.43	28.57
Probabilidad		0.4244	0.4244

ns: no significativo

n: número

### Porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos).

Al séptimo día del cultivo se evaluó el porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos). Se clasificaron como degenerados o que hicieron apoptosis aquellos que tenían un citoplasma granuloso y presentaban una división menor a 32 células. Los oocitos que presentaban una división mayor a 32 células se clasificaron como posibles embriones, encontrándose en el estadio de mórula o en la transición de éste a blastocisto. Se evaluó también en aquellos que tuvieran un citoplasma homogéneo (Figura 4).

No hubo diferencias ( $P>0.05$ ) para los embriones obtenidos con respecto a los oocitos en clivaje, madurados y fecundados (Cuadro 3). Ahuja *et al.* (2009) reportaron datos similares en su estudio para embriones obtenidos con respecto a los oocitos fertilizados con un 31.6%, pero menores para los embriones obtenidos con respecto a los oocitos divididos (clivaje) con un 38.5%; la diferencia en los datos se atribuye al medio utilizado que fue KSOM, diferente al que se utilizó en este estudio ya que el medio de cultivo y sus componentes están estrechamente ligados con la producción de embriones. Pomar *et al.* (2005) reportaron datos ligeramente mayores para embriones obtenidos con respecto a los oocitos en clivaje con un porcentaje de 73%, esto se debe posiblemente a que ellos solamente utilizaron oocitos grado uno.

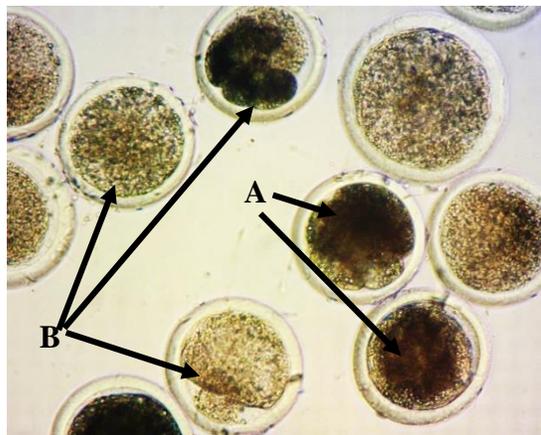


Figura 4. Oocitos al séptimo día en el medio cultivo SOF. A) embriones obtenidos. B) Oocitos en apoptosis

Fernández *et al.* (2007) realizaron un estudio en donde los embriones obtenidos con respecto a los oocitos madurados, fue de 13.6%. Estos datos son menores a los obtenidos en esta investigación, posiblemente porque incluyeron aquellos oocitos que estaban completamente desnudos, o sea sin ninguna capa de las células del *cumulus oophorus* y esto influyó significativamente en sus resultados ya que no obtuvieron mórulas al final de la investigación. Ward *et al.* (2002) reportaron datos similares para los oocitos madurados a las 16 horas con un porcentaje de 20.4%, pero mayores para los oocitos puestos a madurar a las 24 horas con un porcentaje de 39.3%, esto se debe a que ellos reportaron tasas de clivaje mayores.

Cuadro 3. Porcentaje de embriones obtenidos en relación a los oocitos madurados, fecundados y en clivaje.

Tiempo de maduración	Embriones/oocitos madurados (ns)	Embriones/oocitos fecundados (%) (ns)	Embriones/oocitos en clivaje (%) (ns)
18 horas	28.00	36.84	63.44
24 horas	21.74	35.71	50.00
Probabilidad	0.6168	0.9469	0.5283

ns: no significativo

### Diámetro, perímetro y área del Macizo Celular Interno (MCI).

Se midieron 15 oocitos pos fecundación de cada tratamiento (18 y 24 horas de maduración), con el programa Dinocapture 2.0 (Figura 5). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en el diámetro, área y perímetro del Macizo Celular Interno (MCI) para los dos tratamientos (Cuadro 4). De acuerdo con Ebner *et al.* (2003) el área del MCI de los blastocistos expandidos debe ser  $>4500 \mu\text{m}^2$  la cual está relacionada con el área del MCI post fecundación, lo que en este estudio fue mayor por lo que se considera aceptable.

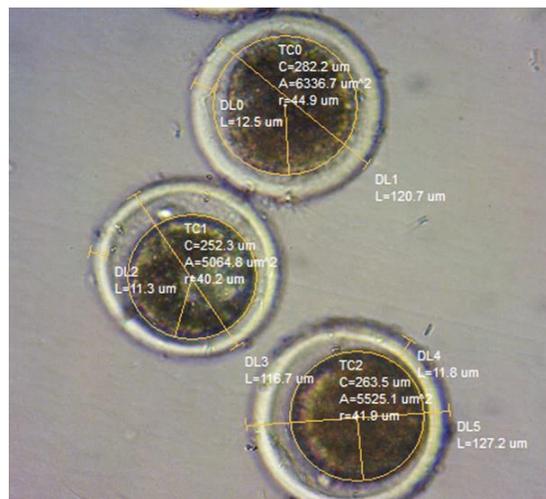


Figura 5. Oocitos post fecundación medidos con el programa Dinocapture 2.0

Cuadro 4. Diámetro, área y perímetro del Macizo Celular Interno (MCI) de oocitos bovinos pos fecundación.

Tiempo de maduración	Diámetro del MCI (μm) (ns)	Área del MCI (μm <sup>2</sup> ) (ns)	Perímetro del MCI (μm) (ns)
18 horas	86.59 ± 4.36	5903.65 ± 589.04	272.05 ± 13.73
24 horas	88.47 ± 5.44	6169.36 ± 765.83	277.95 ± 17.10
Probabilidad	0.3071	0.2959	0.3058
CV	5.6337	11.3174	5.6394

ns: no significativo

cv: coeficiente de variación

### Diámetro externo y grosor de la zona pelúcida.

No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en el diámetro externo y el grosor de la zona pelúcida (Cuadro 5). Datos similares fueron encontrados por Fair *et al.* (1995) quienes evaluaron diferentes diámetros de oocitos, y encontraron que los oocitos adquieren una habilidad de completar la maduración a metafase II con un diámetro de 110 μm. Con un diámetro de  $> 120$  μm se obtiene un mayor porcentaje de oocitos que llegan hasta metafase II, pero no encontraron diferencias significativas entre estos dos diámetros. Gordon (2003) reportó que se necesita un oocito con diámetro de 100-110 μm para que el oocito este competente para la maduración y tenga un desarrollo embrionario.

Quintana *et al.* (2012) evaluaron la morfometría de ovocitos de *Bubalus bubalis*, encontrado que el grosor de la zona pelúcida era de 17.79 μm y 167.14 μm el diámetro de oocito. Estos datos son ligeramente mayores a los obtenidos en este estudio posiblemente por la diferencia entre especies. Palma (2008) planteó que el grosor de la zona pelúcida en el bovino puede ser hasta 27 μm y Pagés y Aller (2006) plantearon un grosor de la zona pelúcida de 15 μm para oocitos humanos que son similares a los de las bovinos por ser mamíferos euterianos los dos.

Cuadro 5. Diámetro externo y grosor de la zona pelúcida de oocitos bovinos pos fecundación.

Tiempo de maduración	Diámetro externo (μm) (ns)	Grosor de zona pelúcida (μm) (ns)
18 horas	124.32 ± 5.35	11.88 ± 1.52
24 horas	125.12 ± 7.32	12.14 ± 1.96
Probabilidad	0.7350	0.9469
C.V	5.1382	14.6127

ns : no significativo

cv: coeficiente de variación

#### **4. CONCLUSIONES**

- Bajo las condiciones de este estudio los tiempos de maduración de 18 y 24 horas no afectaron los porcentajes de maduración, fertilización, clivaje, apoptosis y los embriones obtenidos a los siete días con respecto a los oocitos en clivaje, madurados y fecundados.
- El diámetro externo, grosor de la zona pelúcida y el área, perímetro y diámetro del macizo celular interno (MCI) fueron similares a las 18 y 24 horas de maduración de los oocitos.

## 5. RECOMENDACIONES

- Bajo las condiciones de Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano se recomienda hacer uso de 18 horas para maduración de oocitos en fertilización *in vitro* en bovinos ya sea para fines de investigación, educativos o productivos.
- Realizar futuras investigaciones con diferentes protocolos de maduración y medios de cultivo (KSOM, CR-1) y un mayor número de oocitos.
- Desarrollar investigaciones donde se obtengan medidas en las diferentes etapas de desarrollo del embrión para generar información para futuros estudios.

## 6. LITERATURA CITADA

- Ahuja Aguirre C, Montiel F, Pérez P, Gallegos J. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootec Trop*. 27(3):277-284.
- Aponte JL, Villamediana P, Fonseca HH, Belloso ES. 2010. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. *Rev cient*. 20(6):659-664.
- Caicedo JE. 2008. Aplicaciones de la aspiración folicular - fertilización *in vitro* en bovinos y factores que pueden afectar su eficiencia [Monografía]. Universidad La Salle-Bogotá. 24 p.
- De los Reyes S. 1994. Fecundación *in vitro* en bovinos: Avances en el manejo de gametos. *Av cienc Vet*; [consultado 2017 jul 25].9 (1). <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewArticle/6142/6000>.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. 2003. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: A review. *Hum Reprod Update*. 9(3):251–262.
- Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*. 42(4):437-442
- Fernández A, Díaz T, Muñoz G. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev fac cs Vets, UCV*; [consultado 2017 sep 2]. 48(1):51-60. es. <http://www.redalyc.org/pdf/3731/373139068005.pdf>.
- Gallegos MP. 1998. Fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos [Tesis]. Universidad Autónoma de Nuevo León-Marín, Nuevo León. 99 p.
- González R, Soto E, Delgado N, Portillo G, De Ondiz A, Velarde JC. 1992. Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. *Rev cient FCV-LUZ*: [consultado 2017 ago 22] II (2):11-13. es. [http://www.fcv.luz.edu.ve/images/stories/revista\\_cientifica/1992/02/articulo2.pdf](http://www.fcv.luz.edu.ve/images/stories/revista_cientifica/1992/02/articulo2.pdf)
- Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Oxon UK: CABI Publishing. ISBN: 0-85199-666-3. xxviii, 548 p.

- Hansen PJ. 2013 Oct. *In Vitro* production of bovine embryos: P.J Hansen Laboratory. La Florida: University of Florida, Dept. of Animal Science.
- Hernández Fernández A, Nava H, Vílchez V. 2010. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in vitro*. *Prod Agropecu/Sanid Anim*; 3(1):41–44.
- Lorenzo PL. 1992. Maduración *in vitro* de oocitos de ganado vacuno [Tesis]. Universidad Complutense de Madrid-España. 245 p.
- Martínez YM. 2013. Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a la fecundación *in vitro* [Tesis]. Universidad de Oviedo-Austrias, España. 36 p.
- Pagés G, Aller J. 2006. Infertilidad: Fisiología, diagnóstico y tratamiento. 1 ed. Caracas, Venezuela: AMOLCA. 583 p. ISBN: 9789806574571.
- Palma GA. 2008. Biotecnología de la reproducción. 2 ed. Mar del Plata: Reprobiootec. 669 p. ISBN: 978-987-05-3271-2.
- Pomar FR, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, Roelen B. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: A comparative study. *Theriogenology*; [consultado 63(8):2254–2268.
- Quintana MD, Campos P, Herrera P, Gallego C, Padrón E. 2012. Caracterización morfométrica de ovocitos de *Bubalus bubalis* en Cuba. *Rev Salud Anim*. 34(2):131–133.
- Quintanilla ML, Huanca LW, Córdova GA, Ampuero BA, Benavides IL. 2015. Efecto de la suplementación del medio de maduración con Cisteamina y de dos medios de cultivo (KSOMaa y SOF) en la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos. *Rev Inv Vet Perú*; 26(3):462–468.
- Urribarrí Y, Hernández JP, Villamediana P, Mosquera J, Pirela A, Peláez J, Hernández H. 2012. Estudio ultraestructural de embriones bovinos producidos *in vitro* durante las etapas del desarrollo temprano y tardío. *Rev cient FCV-LUZ* (3):201-210.
- Tarazona AM, Olivera AM, Lenis YY. 2010. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Arch med vet*. 42(3):125–133.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57(8):2105–2117.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Preparación de las soluciones madre (soluciones stock).

**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 un mes.

**Solución 3:** Suero de novillo (bovino) (BSS). Preparar 10 mL de BSS en tubos estériles de 13 mL y almacenarlas 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 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 dos meses.

**Solución 6:** Folltropin. Reconstituir Folltropin-V según lo recomendado por el fabricante para preparar 20 microgramos/microlitro de solución. Poner 150 microlitros en tubos estériles de micro-centrífuga de 1.5 mL y almacenarlas indefinidamente a -20 °C.

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

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

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

**Solución 9:** Mezcla de PHE. Prepare solución primaria de 1 mililitro de hipotaurina (1.09 mg en 10 mL de solución salina), 2 mililitros penicilamina (3 mg en 10 mL de solución salina) y 250 microlitros de epinefrina [disolver 1.83 mg en 40 mL de una solución de lactato-Metabisulfito (9A)]. La epinefrina se oxida fácilmente, tener

precaución de proteger el procedimiento de la luz directa, cubrir con papel aluminio en 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. Forme soluciones de 400 microlitros 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 microlitros de una solución de lactato del 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 10:** Glutamina (1mL). 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 °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 °C indefinidamente.

**Solución 12:** MgCl<sub>2</sub> para Percoll. Prepare la solución de 0.1 M agregando 0.203 g de MgCl<sub>2</sub> a 10 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C indefinidamente.

**Solución 13:** CaCl<sub>2</sub> para Percoll. Preparar la solución de 1 M agregando 0.735 g CaCl<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O a 5 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C indefinidamente.

**Solución 14:** Hyaluronidasa. Preparar la solución común de hyaluronidasa tipo IV en 10.000 unidades/mL de solución salina, esterilizarla a través de un filtro de 0.2 micras en un tubo estéril, y almacenar 100 microlitros en tubos estériles de microcentrífuga a -20 °C indefinidamente.

**Solución 15:** Penicilina/Estreptomina (4 mL). Descongele la botella de 100 mL de penicilina/Estreptomina y forme soluciones de 4 mL en tubos estériles de 5 mL y almacénense a -20 °C indefinidamente.

**Solución 16:** Penicilina/Estreptomina (10 mL). Descongele la botella de 100 mL de Penicilina/Estreptomina haga soluciones de 10 mL en tubos estériles de 13 mL consérvelos a -20 °C indefinidamente.

**Solución 17:** NaCl. Disolver 6.665 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C.

**Solución 18:** KCl. Disolver 0.588 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril en 4 °C.

**Solución 19:** NaHCO<sub>3</sub>. Disolver 1.052 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C para una semana solamente.

**Solución 20:** PO<sub>4</sub>. Disolver 0.235 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °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:** CaCl<sub>2</sub> para TL. Disolver 1.470 g CaCl<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estériles a 4 °C.

**Solución 23:** MgCl<sub>2</sub> para el TL. Disolver 1.017 g MgCl<sub>2</sub>+ 6H<sub>2</sub>O en 50 mL de agua. Filtrar/almacenar estéril a 4 °C.

**Solución 24:** Suero Fetal Bovino. Preparar soluciones de 100 microlitros de Suero Fetal Bovino inactivado por calor, en tubos estériles de micro centrifuga 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 0.22µm. hacer alícuotas de 600 µl en tubos eppendorf estériles y guardar a -20 °C indefinidamente.

## **Anexo 2.** Preparación de las soluciones de trabajo

**Solución Salina de Transporte de Ovarios (0.9%).** Solución salina al 0.9% (NaCl 9 g por litro) en agua bidestilada. Almacenar indefinidamente a 4 °C.

**Medio de Colección de Ovocitos (MCO).** Utilizar el medio TCM-199 SIGMA 7528. Ajustar el pH a 7.2-7.4. Viene en envases de 400 mL. Un día antes de usar se debe mezclar con:

Solución # 4: BSS + Heparina

Solución # 11: glutamina (4 mL)

Solución # 15: Penicilina/Estreptomina (4 mL).

Colocarle al envase la etiqueta de MCO suplementado con la fecha, refrigerar a 4 °C y almacenar máximo por una semana.

## **Medio de Maduración de Oocitos (MMO)**

Tomar 87 mL del medio TCM-199 SIGMA 4530 y agregar la noche antes de usarlo:

Solución # 3: BSS

Solución # 8: gentamicina

125 microlitros solución # 6: Folltropin

200 microlitros solución # 5: Estradiol

1 mL solución # 2: Piruvato de Sodio

1 mL solución # 25: Glutamax, adicionar 500µL.

Colocar etiqueta de MMO suplementado, fecha, almacenar a 4 °C y utilizar en un plazo de una semana.

### **Soluciones de Tyrode Lactato (TL) – para la preparación de los Tyrode’s Albúmina Lactato Piruvato (TALPs).**

Mezclar los ingredientes como se describe en la Cuadro 1 (todos los volúmenes están en mililitros), ajustar el pH, esterilizar por filtración en 0.22  $\mu\text{m}$ . Colocar la fecha y el vencimiento en la etiqueta (una semana) y almacenar a 4 °C.

Formulación para la preparación de las soluciones del Tyrode’s Lactato (TL)

<b>Ingrediente</b>	<b>Sp-TL</b>	<b>HEPES-TL</b>	<b>IVF-TL</b>
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: bicarb (mL)	10.00	1.6	5.0
Solución 20: phosphate (mL)	1.0	2.0	0.50
Solución 1: Na-lactate (mL)	0.368	0.372	0.093
Solución 21: HEPES (mL)	1.0	2.0	0
Solución 22: Ca chloride (mL)	1.0	2.0	0.50
Solución 23: Mg chlor (mL)	1.10	1.0	0.25
pH	7.4	7.3	7.4
Osmolaridad (mOsm)	295-305	275-285	290-300

### **Medios Tyrode’s Albumina Lactato Piruvato (TALP)**

Preparar los medios de acuerdo al Cuadro 2. Esterilizar en 0.22 $\mu\text{m}$ , colocar la fecha de vencimiento en la etiqueta (una semana), y almacenar a 4 °C.

Formulación para los medios de TALP

<b>Ingrediente</b>	<b>Sp-TL</b>	<b>HEPES-TL</b>	<b>IVF-TL</b>
TL (mL)	38.0	100.0	50.0
BSA, Fracción V (mg)	240	300	0
BSA, EFAF (mg)	0	0	300
Solución 2: piruvato (mL)	2.0	1.0	0.5
Solución 8: gentamicina ( $\mu\text{L}$ )	80	150	50
Solución 7: heparina ( $\mu\text{L}$ )	0	0	250

### **Preparación del medio 10x SP-TL:**

En 100 mL de agua:

NaCl	4.675 g
KCl	0.23 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	0.40 g
HEPES	2.38 g

Ajustar el pH a 7.3, y esterilizar por filtración en 0.22  $\mu\text{m}$  y almacenar indefinidamente a 4 °C

### **Percoll 90%**

- Colocar 4 mL de 10X SP-TL en un vaso volumétrico pequeño y agregar 0.084 gr de bicarbonato de sodio y 90  $\mu$ L de Lactato de Sodio (Solución 1).
- Mezclar hasta que el bicarbonato se disuelva.
- Agregar 36 mL Percoll.
- Agregar 158  $\mu$ g de  $MgCl_2$  (Solución 12) y 78  $\mu$ g de  $CaCl_2$  (Solución 13).
- Mezclar y ajustar el pH a 7.3-7.45, esterilizar por filtración en 0.45  $\mu$ m (en un tubo filtrante de 50 mL). Mezclar suavemente para evitar que se forme precipitado.

### **Fluido Sintético de Oviducto (SOF)**

Medio de Cultivo:

Stock A: A filtrar 0.22 $\mu$ . Utilización 2 meses. Conservación 4 °C.

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

Stock B: No filtrar. A preparar cada semana.

<b>Producto</b>	<b>Referencia SIGMA</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O	W1503	50mL
NaHCO <sub>3</sub>	S5761	1.050g
Rojo de Fenol	P0209	200 $\mu$ l

Stock C: No filtrar. A preparar cada semana.

<b>Producto</b>	<b>Referencia SIGMA</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O	W1503	50mL
Sodio Piruvato	P3662	0.400g

Stock D: A filtrar 0.22 $\mu$ . Utilización 2 meses. Conservación 4°C.

<b>Producto</b>	<b>Referencia SIGMA</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O	W1503	50mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	C7902	1.310

SOF: A hacer cada semana. Verificar la presión osmótica que debe oscilar entre 270-285mOsm. Filtrar 0.22 $\mu$ . Conservación 4 °C.

<b>Producto</b>	<b>Referencia SIGMA</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O	W1503	39mL
Sodio tri-citrato	S4641	0.005g
Myo-inositol	I7508	0.025g
Stock A		5mL
Stock B		5mL
Stock C		0.5mL
Stock D		0.5mL
BME	B6766	1.5mL
MEM	M7145	0.5mL
Glutamina	G6392	50 $\mu$ l
Gentamicina	G1272	0.250mL

Medio de cultivo: Filtrar a 0.22 $\mu$ m

<b>Producto</b>	<b>Referencia SIGMA</b>	<b>Cantidad</b>
SOF		10mL
BSA	A8806	0.040g
		Vórtex
ITS		50 $\mu$ l