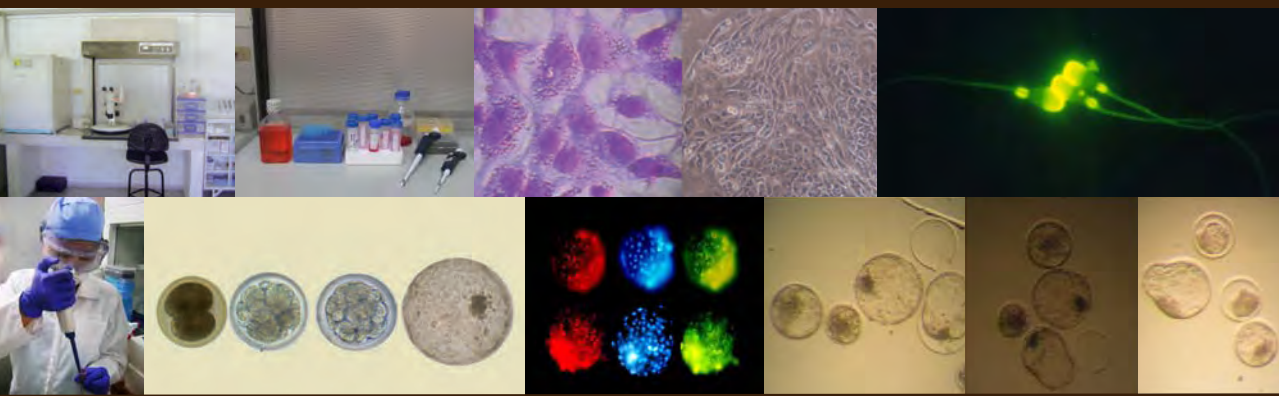


Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos

—Libro de procedimientos—



Martha Olivera Angel
Carlos Andrés Giraldo Echeverri
—Editores académicos—



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

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

Autores

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

Editores

Martha Olivera Ángel
Carlos Andrés Giraldo Echeverri

Agradecimientos a COLCIENCIAS
Proyecto 1115-452-2153

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

Grupo de Investigación Biogénesis
Universidad de Antioquia

2014

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

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

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

Corrección de texto e indización
Diego García Sierra

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

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



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

Autores

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

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

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

Carolina Mesa Pineda
Zootecnista

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

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

Felipe Penagos Tabares
Estudiante de Medicina Veterinaria

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

Juliana Victoria Bedoya Jaramillo
Estudiante de Medicina Veterinaria

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

María Catalina Arias Londoño
Zootecnista

Martha Olivera Ángel
Médica Veterinaria, Doctora en Ciencias Agrarias

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

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

Zulma Tatiana Ruiz Cortés
Médica veterinaria, Doctora en Ciencias
Veterinarias

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

Fondo Editorial Biogénesis, 2014

175 p.

ISBN: 978 958 8848 938

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

Contenido

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

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

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

Capítulo 3 Cultivo de células del tracto reproductivo de la hembra bovina..... 71

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

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

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

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

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

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

Introducción

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

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

Esperamos que esta publicación sea del agrado de los lectores.

