



## Capítulo 2

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

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

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

## Recomendaciones generales para la preparación de medios

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

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



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

## Preparación de los diferentes medios y reactivos

### Solución salina fisiológica

Para preparar 1 litro de solución:

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



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

## Solución salina yodada

Para preparar 1 litro de solución:

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

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

Para preparar 1 litro de solución:

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

| Nombre             | Fórmula  | Cantidad | Ubicación            | Marca y referencia |
|--------------------|--|----------|----------------------|--------------------|
| Cloruro de sodio   | NaCl   | 80 g     | Temperatura ambiente | Sigma S-5886       |
| Cloruro de potasio | KCl  | 2 g      | Temperatura ambiente | Sigma P-5405       |
| Fosfato de sodio   | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O | 14,4 g   | Temperatura ambiente | Sigma S-9638       |
| Fosfato de potásio | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | 2,4 g    | Temperatura ambiente | Sigma P-5655       |

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

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

## Solución salina buferada fosfatada PBS 1X

Para preparar 1 litro de solución:

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

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

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

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

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

Para preparar 50 ml de medio:

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



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

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

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

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

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

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

## Medio HEPES de trabajo

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

### Para preparar 50 ml de medio:

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

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

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

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

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

Para preparar 10 ml:

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

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

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

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



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

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

### Para preparar 10 ml:

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

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

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

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

## Medio para cultivo de endometrio

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

### Para preparar 50 ml de medio:

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

## 3. Adicionar los siguientes suplementos:

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

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

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

## Preparación de Hank's Balanced Salt Solution

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

### Para preparar 15 ml de medio:

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

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

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

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





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

## Solución hiposmótica para test de Host

Para preparar 50 ml de solución:

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

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

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

## Solución de inducción de reacción acrosomal (MI)

Para preparar 4,5 ml de medio:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Procedimiento:

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

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

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

## Percoll al 90% y 45%

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

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



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

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

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

#### **Procedimiento:**

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

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

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

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

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

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

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

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

## Medio de maduración *in vitro*

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

### Para preparar 5 ml:

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

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

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

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

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

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

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



## Medio de fertilización TL modificado stock

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

### Para preparar 50 ml de medio:

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

2. Pesar y adicionar los siguientes reactivos:

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

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

4. Adicionar:

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

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

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

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

## Medio de fertilización de trabajo (Fert)

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

### Para preparar 5 ml:

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

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

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

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

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

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



## Medio Talp Sperm Stock

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

Para preparar 50 ml de medio:

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

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

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

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

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

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

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

## Medio Talp Sperm de trabajo

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

### Para preparar 5 ml:

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

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

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

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

## Medio de desarrollo CR1-AA Stock

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

### Para preparar 50 ml de medio:

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

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





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

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

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

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

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

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

## Medio de desarrollo CR1-AA de trabajo

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

### Para preparar 5 ml:

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

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

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

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

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

### Solución Giemsa

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

#### Procedimiento:

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

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

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



## Solución eosina nigrosina

Para preparar 100 ml de solución:

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

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

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

## Solución de la tinción PISUM - FITC

Solución colorante fluorescente para evaluación de reacción acrosomal.

### Precauciones:

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

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

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

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

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

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

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

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

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

### **Ioduro de propidio**

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

### **Solución naranja de acridina para celularidad**

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

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



## Solución de tinción JC-1

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

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

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

## Solución Z-VAC-FMK

Solución colorante fluorescente para evaluar la actividad de las caspasas.

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

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

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

Solución colorante fluorescente para evaluación de apoptosis.

### Para preparar alícuotas y solución de trabajo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

**Para preparar 15 ml:**

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

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

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

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

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

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

## Nucleótidos dUTPs (stock del kit de 50 µL)

Este reactivo hace parte del kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System

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

## Preparación del mix de reacción

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

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

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Buffer de equilibrio | 45 µl |
| Mix dUTPs            | 5 µl  |
| Enzima rTDT          | 1 µl  |

3. Mantener a 4°C hasta el momento de su uso.

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

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

1. Diluir 1 ml de SSC 20X en 10ml de H<sub>2</sub>O desionizada y agitar con vórtex.
2. Alicuotar en volúmenes de 200 µl y marcar con el nombre, la fecha y el volumen (5 alícuotas iniciales).
3. Almacenar el stock de trabajo y las alícuotas a temperatura ambiente. Cubrir con parafilm para evitar su evaporación.





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

## Solución pronasa 0,5%

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

## Activación de buffer de lisis RTL plus:

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

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

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

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

## Solución EDTA

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

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

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

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

### Para preparar 1 litro de buffer:

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

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

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

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

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

### Medios para vitrificación de embriones bovinos

#### Medio de mantenimiento para embriones bovinos.

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

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

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

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

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

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

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



- Adicionar los siguientes suplementos:

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

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

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

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

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

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

## Solución de sucrosa (MS)

Para preparar 50 ml de medio:

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

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

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

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

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

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

### Soluciones de calentamiento M1, M2 y M3

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

| Nombre | Tubo | Medio de Mantenimiento (MM)<br>(Ver medios de vitricación de embriones) | Medio Sucrosa (MS) |
|--------|------|---|--------------------|
| M1     | 1    | 800 $\mu$ l   | 400 $\mu$ l        |
| M2     | 2    | 800 $\mu$ l   | 200 $\mu$ l        |
| M3     | 3    | 800 $\mu$ l   | No requiere        |