

Capítulo 5

Procedimientos para producción de embriones bovinos *in vitro*

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

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

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

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

Toma de muestras: recolección de ovarios

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

Procedimiento:

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



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



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

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

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

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

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

Aspiración folicular

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

dérmicas 18Gx1^{1/2}, tubos cónicos de 15 ml estériles forrados en aluminio, gradilla para tubos y marcador.

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

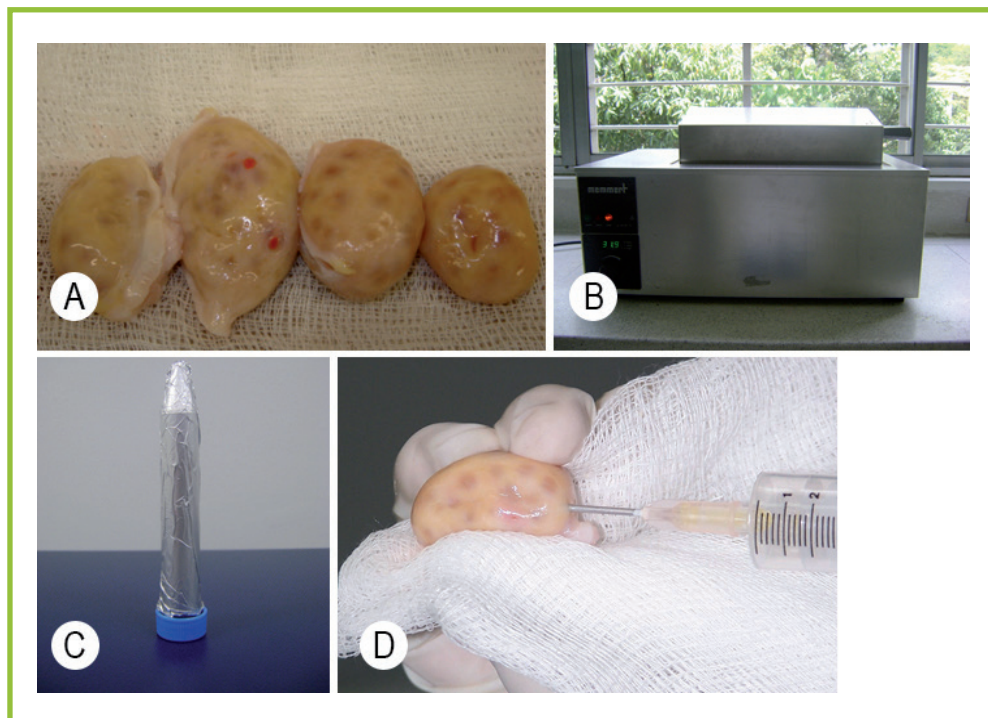


Figura 5.3. Materiales para aspiración folicular. A: ovarios, B: baño serológico, C: tubos cubiertos de papel aluminio, D: jeringas y agujas.

Procedimiento:

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



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

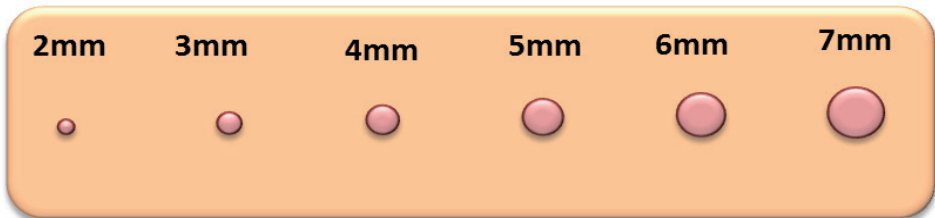


Figura 5.4. Diagrama de diámetros para aspiración folicular de ovarios bovinos.

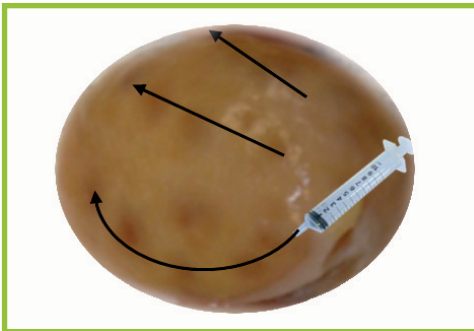


Figura 5.5. Guía de aspiración folicular en ovarios bovinos.

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

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

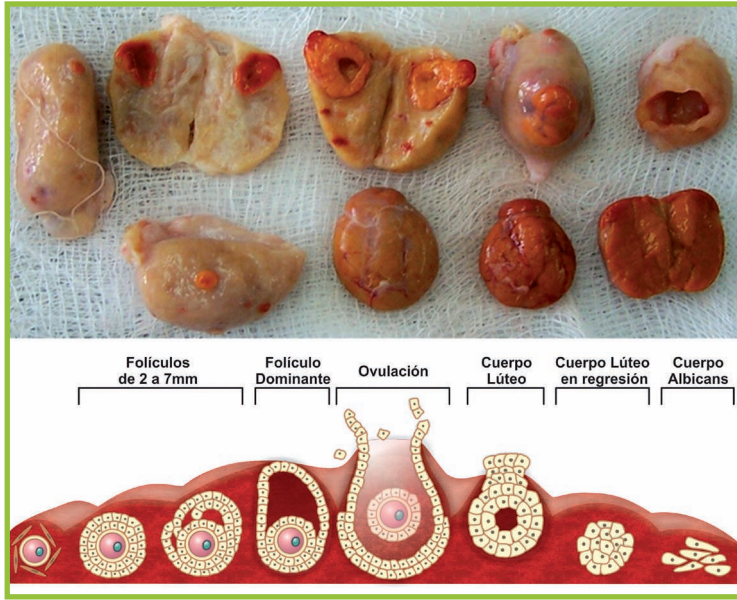


Figura 5.6. Estructuras encontradas en ovarios de bovinos.

Selección de Complejos Cúmulo-Oocito (CCO) para maduración

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

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

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

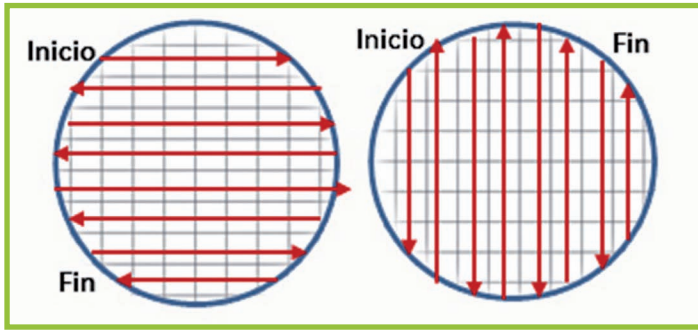


Figura 5.7. Guía de búsqueda de CCO en cajas de Petri.



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

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

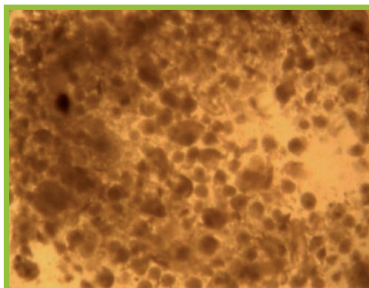
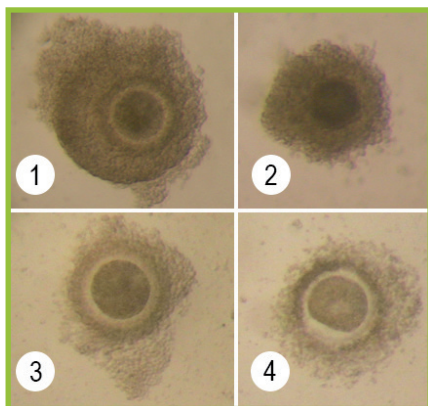


Figura 5.9. Visualización de líquido folicular en el estereoscopio.

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

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

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

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

Maduración *in vitro*, MIV

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



- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Aceite mineral y medio de maduración de trabajo (ver capítulo 2), previamente calentados y gasificados en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO₂.
- **Procedimiento:** En cabina de flujo laminar:
 - Preparar las cajas para la maduración (ver figura 5.11), colocando gotas de 20 µl de medio de maduración (paso 1), cubrir con 3,5 ml de aceite mineral (paso 2) y adicionar a cada gota 30 µl más de medio (paso 3). Marcar las cajas así: MIV, consecutivo del proceso, fecha y número de caja. Guardar la caja en la incubadora de CO₂. En una caja extra realizar el lavado de los oocitos de la siguiente forma: colocar dos gotas de 100 µl de HEPES y una gota de 100 µl de medio de maduración.



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

- Tomar los oocitos seleccionados, lavarlos y pasarlos por las dos gotas de HEPES y por la gota con medio de maduración. Finalmente, sembrar entre 10 y 12 oocitos en cada gota de la caja de maduración e incubar por 24 horas a 38,6°C, 6% CO₂ y 90% de humedad (ver figuras 5.12 y 5.13).

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

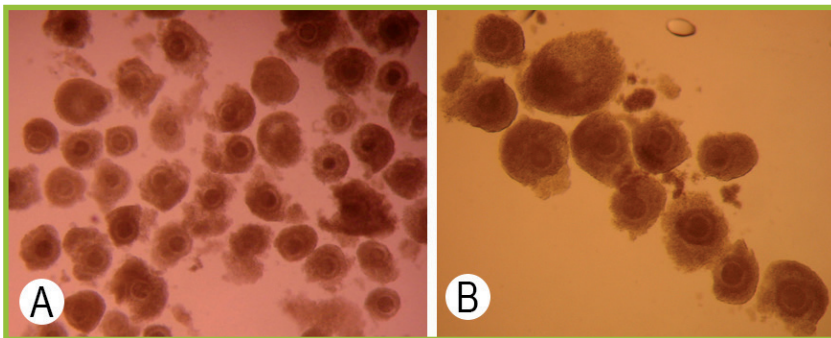


Figura 5.12 A. Primera selección de CCOs, calidades 1, 2 y 3; B. CCOs seleccionados para maduración *in vitro*, calidades 1 y 2.

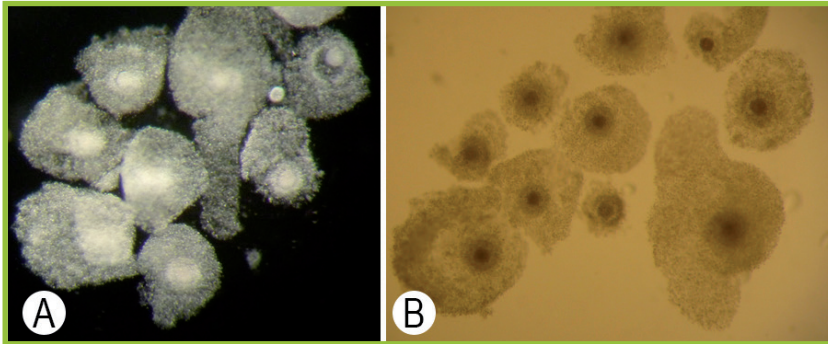


Figura 5.13 A. Expansión de granulosa 24 h de maduración (campo oscuro); B. Expansión de granulosa 24 h de maduración (Campo claro)

Fertilización in vitro FIV

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la descongelación adecuada de pajillas de semen bovino criopreservado, la metodología para la selección y capacitación espermática y los procedimientos para la fertilización *in vitro* de oocitos madurados *in vitro*.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, tubos de microcentrífuga de 0,6 y 1,5 ml, micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l, cajas de Petri de 35 y 60 mm, tijeras rectas, termo plástico o frasco de cristal de boca ancha, cámara de Neubauer, toallas absorbentes de papel, termómetro, cronómetro y alcohol 70%.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Percoll 90%, medio de maduración de trabajo, medio de fertilización de trabajo (ver capítulo 2) y aceite mineral, previamente calentados y gasificados en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO₂, microcentrífuga, baño serológico.

Procedimiento:

Descongelación:

- Preparar las cajas para la fertilización colocando gotas de 20 μ l de medio de fertilización en ellas (paso 1), cubrir con 3,5 ml de aceite mineral (paso 2) y adicionar a cada gota 20 μ l más de medio (paso 3) (ver figura 5.14). Marcar las cajas así: FIV, consecutivo del proceso, fecha y número de caja. Guardar la caja en la incubadora de CO₂.

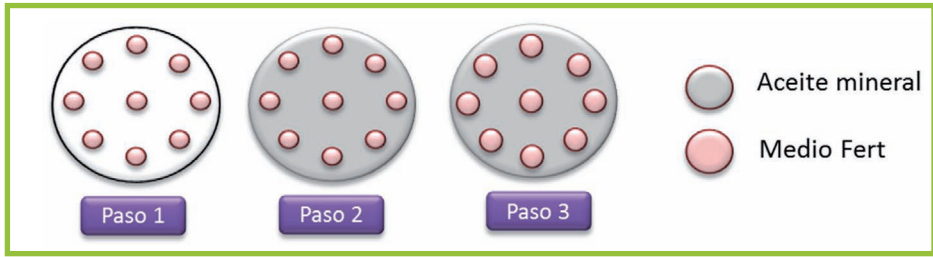


Figura 5.14 Diagrama de preparación de cajas para fertilización *in vitro*

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

Tabla 5.2. Clasificación de la movilidad espermática

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

Selección y capacitación espermática:

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

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

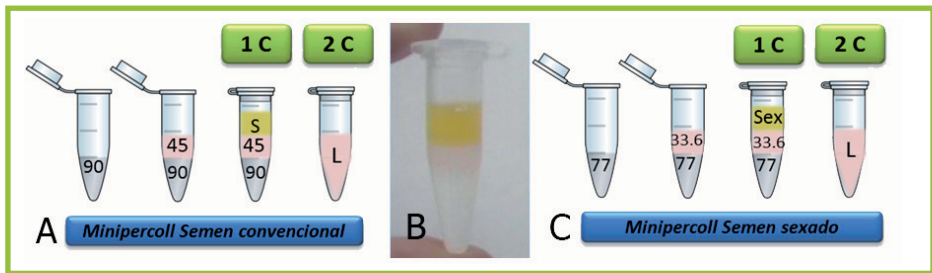


Figura 5.15 A. Diagrama del gradiente minipercoll para semen convencional; B. Gradiente minipercoll preparado; C. Gradiente minipercoll para semen sexado.

Fallas en el gradiente

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

Interacción de los gametos

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



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

Recuento y dilución espermática para FIV

- Añadir 40 μ l de medio de fertilización trabajo al botón de semen y homogenizar.

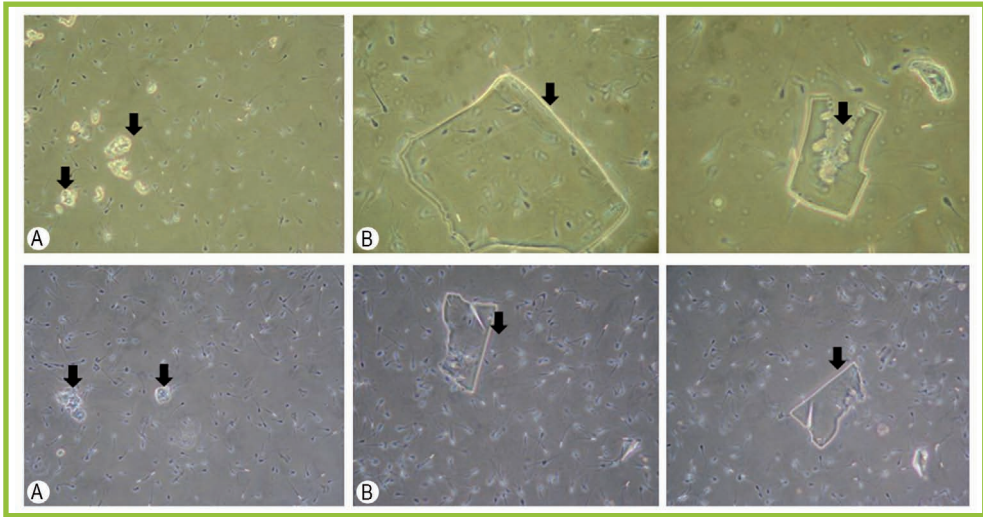


Figura 5.16. Muestras de semen para fertilización *in vitro*. A. Espermatozoides pospercoll (las flechas indican la presencia de detritos); B. Espermatozoides pospercoll (las flechas indican la presencia de cristales de Percoll).

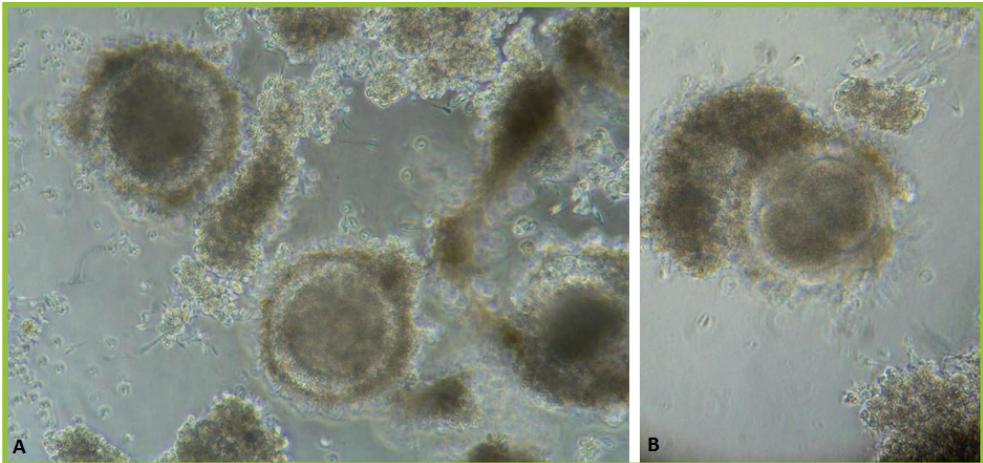


Figura 5.17 A. Oocitos con cúmulo de células de la granulosa y en presencia de espermatozoides durante una fertilización; B. Clivaje de 4 células 18 h posfertilización.

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

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

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

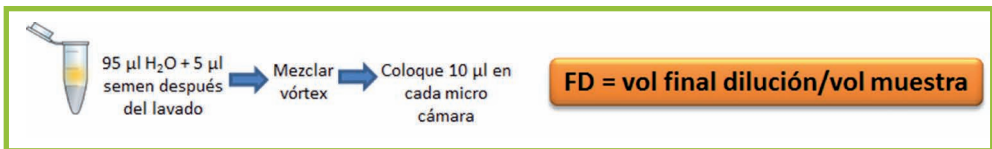


Figura 5.18. Diagrama de dilución de semen para conteo.

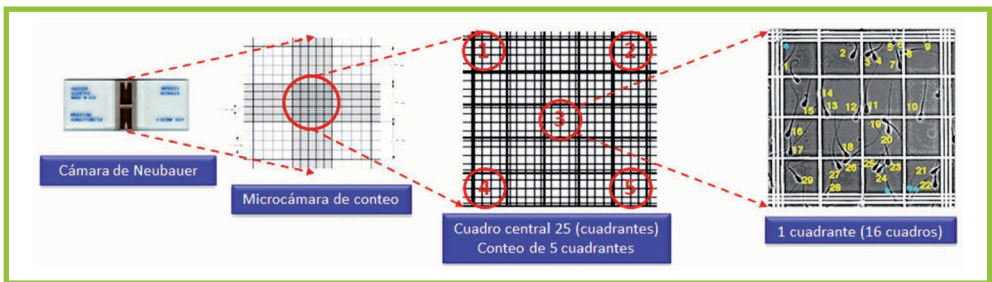


Figura 5.19. Diagrama del uso de cámara de conteo Neubauer.

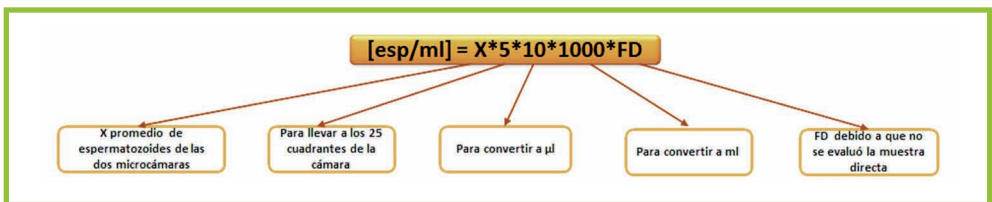


Figura 5.20. Diagrama de la fórmula de cálculo de concentración de espermatozoides.



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

1. Cálculo del volumen de semen para inseminar.

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

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

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



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

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

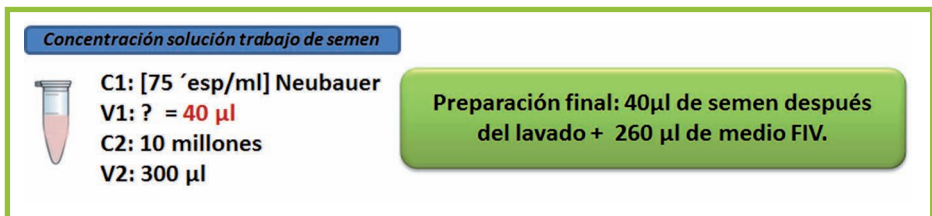


Figura 5.22. Diagrama de preparación de solución de trabajo de semen.

Inseminación in vitro

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

Tabla 5.3. Calidad de la maduración de los oocitos.

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

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

Figura 5.23. Diagrama de preparación de cajas de lavado.

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

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

Cultivo in vitro, CIV

- **Propósito:** Indicar los procedimientos de cultivo para la producción de embriones bovinos *in vitro*.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 35 y 60 mm, micropipetas de 10, 100 y 1000 μl , puntas para las micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Aceite mineral, medio de fertilización de trabajo, medio de desarrollo CR1 AA de trabajo (ver capítulo 2), previamente calentados y gasificados en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO_2 .



Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- Preparar las cajas de cultivo colocando gotas de 20 μl de medio de desarrollo CR1 AA de trabajo, cubrir con 3,5 ml de aceite mineral y adicionar a cada gota 30 μl más de medio. Marcar las cajas así: CIV, consecutivo del proceso, fecha y número de caja. Guardar la caja en la incubadora de CO_2 . En una caja extra (la cual servirá para el lavado de los oocitos), colocar 2 gotas de 100 μl de medio de fertilización de trabajo y una gota de 100 μl de medio de desarrollo (ver figura 5.24).
- Tomar los oocitos de cada gota de las cajas de fertilización, lavarlos y pasarlos por las dos gotas con medio de fertilización para eliminar el exceso de células de la granulosa y los espermatozoides. Luego, ponerlos en la gota con medio de desarrollo y finalmente sembrarlos en cada gota de la caja de cultivo e incubar.

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

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

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la evaluación de clivaje y recambio de medio de cultivo (alimentación) de embriones bovinos *in vitro*.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, micropipetas de 10, 100 y 1000 μl , puntas para las micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios:** Medio de desarrollo CR1 AA de trabajo (ver capítulo 2), previamente calentado y gasificado en la incubadora.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO_2 .

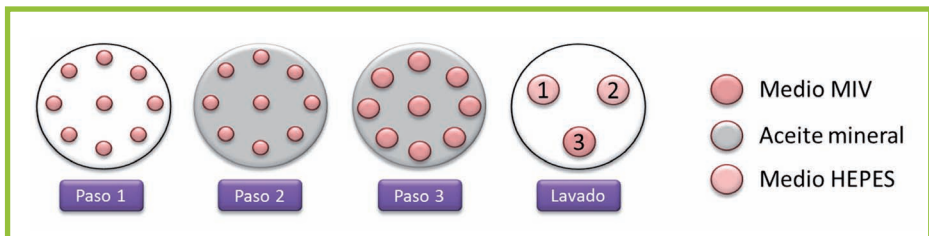


Figura 5.24. Diagrama de preparación de cajas para cultivo *in vitro*.

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

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

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

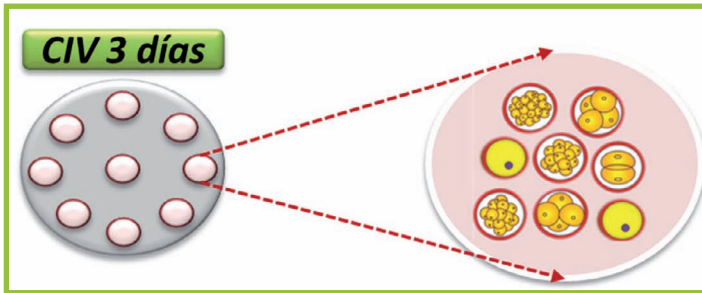


Figura 5.25. Diagrama de células a las 72 horas de cultivo.

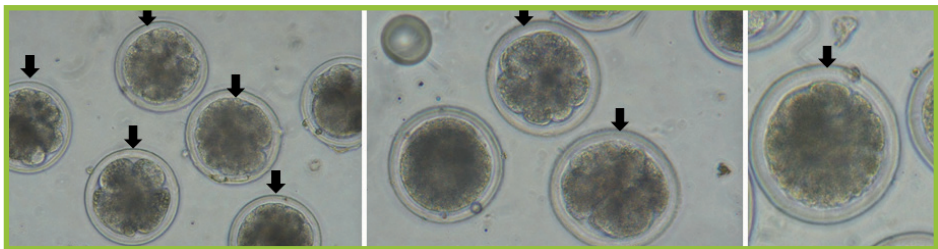


Figura 5.26. Embriones a 72 h poscultivo. Las flechas señalan los embriones clivados con blastómeras uniformes que se tuvieron en cuenta para el porcentaje de clivaje.

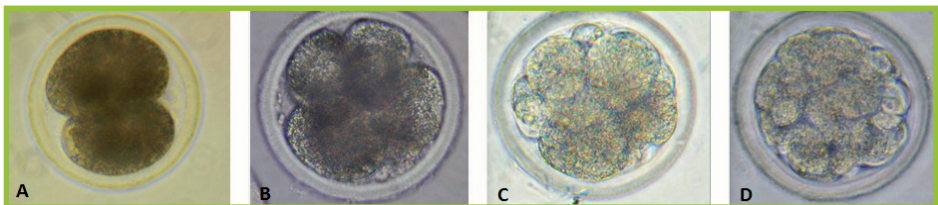


Figura 5.27. A Embrión de dos células; B. Embrión de 6 células; C. Embrión de 8 a 16 células; D. Embrión de 16 a 32 células.



Evaluación de la producción de embriones

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la evaluación de producción de embriones bovinos *in vitro*.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de CO₂.

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

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

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

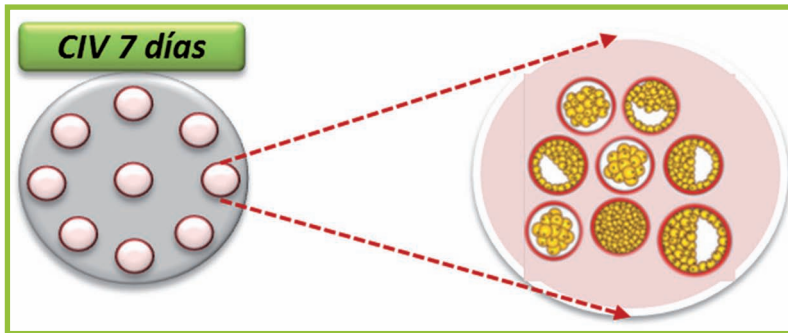


Figura 5.28. Diagrama de embriones el día 7 de cultivo.



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

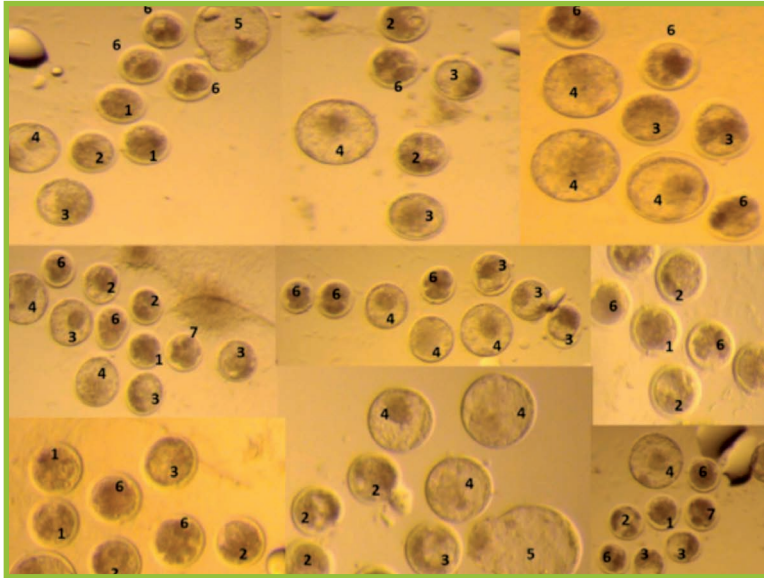


Figura 5.30. Embriones al día siete de cultivo. 1. Mórulas; 2. Blastocistos tempranos; 3. Blastocistos; 4. Blastocistos expandidos; 5. Blastocistos eclosionando; 6. Degenerados; 7. Detenidos. de cultivo.

Proceso de eclosión in vitro

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

Progreso poseclosión in vitro

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

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

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

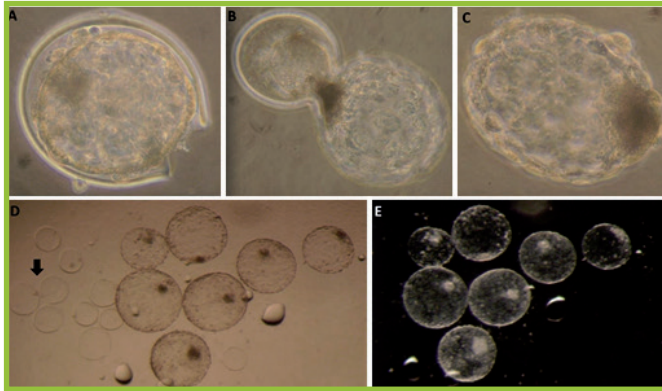


Figura 5.31. A. Embrión con ruptura inicial de zona pelúcida; B. Embrión eclosionando; C. Embrión eclosionado; D. Embriones eclosionados observados en campo claro, la flecha indica zonas pelúcidas vacías; E. Embriones eclosionados observados en campo oscuro.

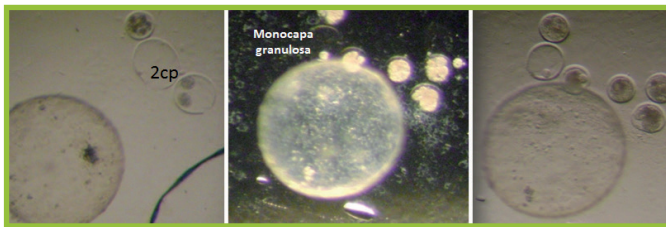


Figura 5.32. A. Embrión eclosionado, la flecha indica dos cuerpos polares; B. Embriones eclosionados observados en campo oscuro; C. Embriones eclosionados observados en campo claro.



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

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

Anormalidades durante el cultivo de embriones

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

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

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

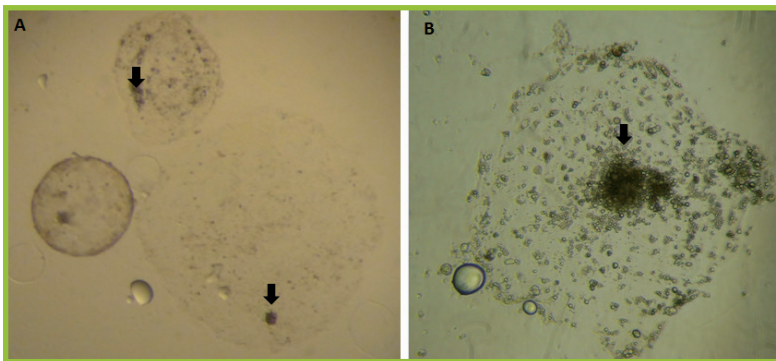


Figura 5.34. A. Dos embriones eclosionados adheridos a la caja de cultivo, las flechas indican los embrioblastos; B. Embrión eclosionado y adherido a la caja de cultivo, la flecha indica el embrioblasto.

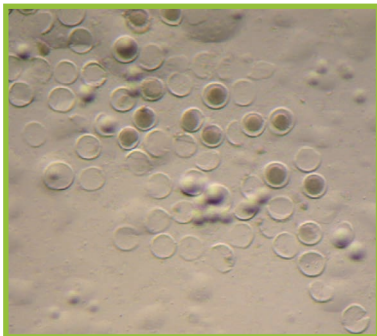


Figura 5.35. Zonas pelúcidas encontradas durante el pipeteo para CIV.

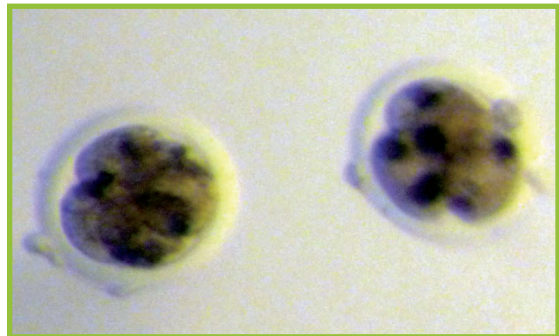


Figura 5.36. Embriones pignóticos.

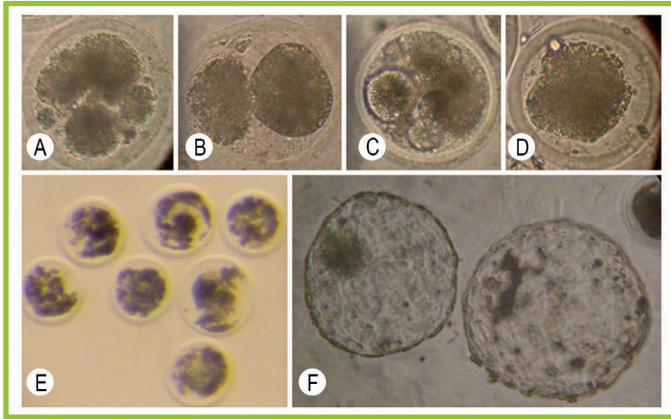


Figura 5.37. A-B-C-D. Embriones con clivajes irregulares; E. Embriones degenerados; F. Embrioblasto no uniforme (derecha).

Empaque y transporte para transferencia de embriones (TE)

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

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

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

Tabla 5.4. Calidad embrionaria al día 7 de cultivo

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

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

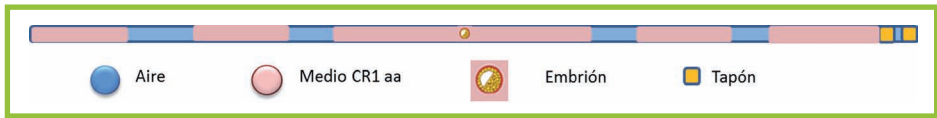


Figura 5.38. Esquema para el empaque de embriones bovinos en la pajilla.

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

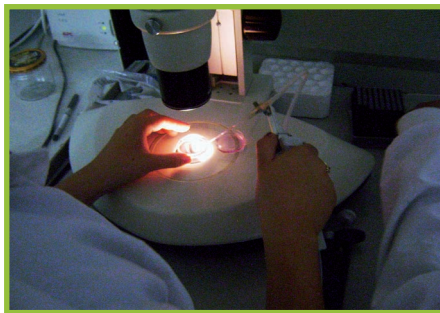


Figura 5.39. Empaque de embriones bovinos.



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

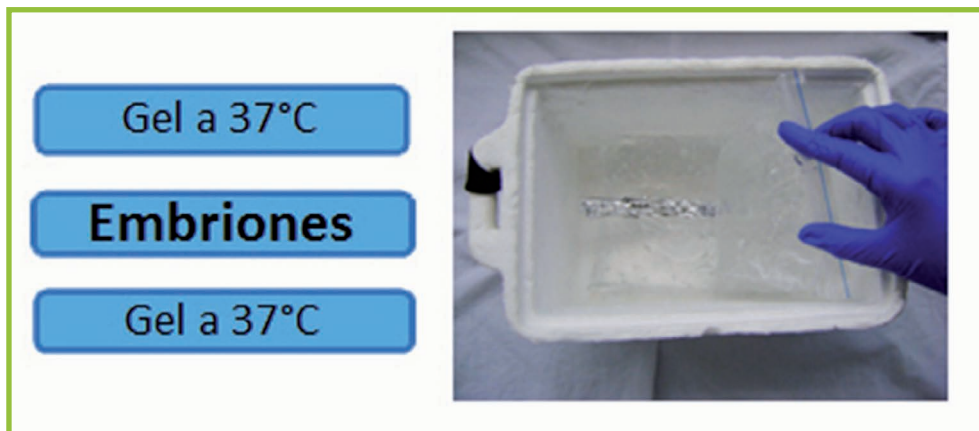


Figura 5.41. Esquema para el empaque de las pajillas en la nevera para el mantenimiento adecuado de la temperatura.

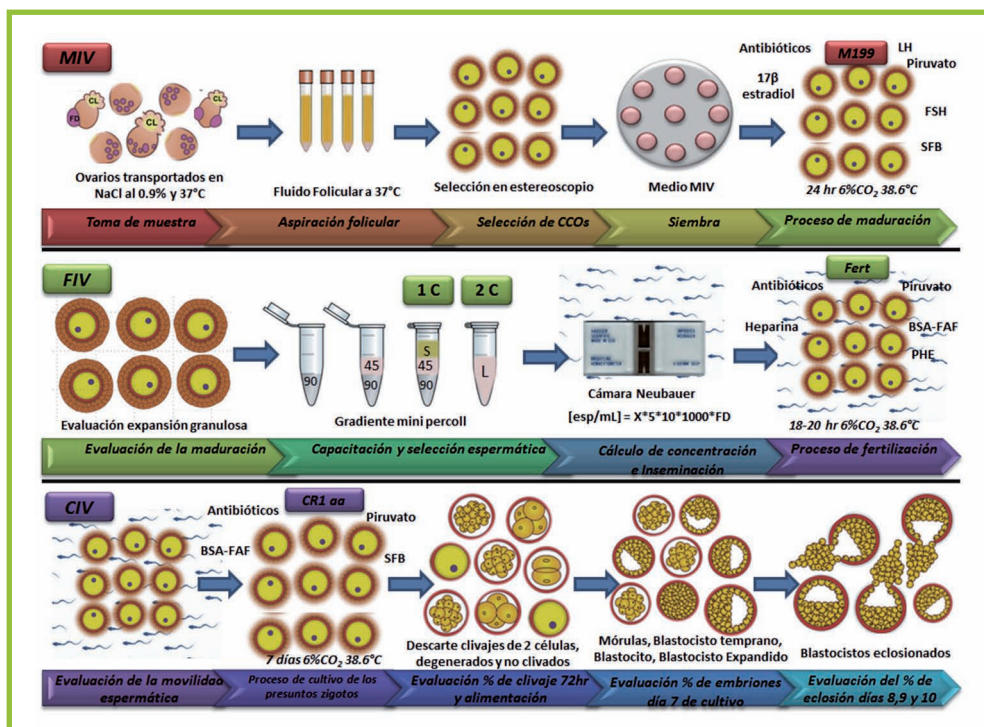


Figura 5.42. Modelo ilustrativo de los procesos principales para la producción de embriones bovinos in vitro.

Anexo 4. Formatos de producción de embriones in vitro

MATADERO Y MADURACIÓN IN VITRO

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

Medio de Miv

Mapa

Observaciones:

--

--

FERTILIZACIÓN IN VITRO

Fecha					
Responsable					
Proceso					
Hora Inicial		Medio			
Hora Final		Evaluación Miv			



Método de Lavado								
Toro		Mov Inicial	Mov Final	C1 X10 ⁶	C2 X10 ⁶	V1	V2	Final X10 ⁶

Mapa

Observaciones:

CULTIVO IN VITRO

Fecha				
Responsable				
Proceso				
Hora Inicial		Medio		
Hora Final				

Mapa

Observaciones:

FEEDING Y EVALUACIÓN

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



Bibliografía recomendada

- Arias C et al (2007). Efecto de la suplementación con alanina y glicina sobre los clivajes iniciales de embriones bovinos producidos in vitro. *Rev MVZ Córdoba* 12(2): 1020-1027.
- Camargo O et al (1999). Radicales libres y desarrollo embrionario. *Rev Col Cienc Pec* 12(2): 108-118.
- Camargo O et al (2008). Modelo teórico para explicar la acumulación de gotas lipídicas en embriones bovinos machos o hembras producidos in vitro. *Acta Biolog Colomb* 13(2): 91-104.
- Gómez N et al (2013). Efecto del ácido linoléico conjugado sobre la proporción de sexos y calidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Archivos de Medicina Veterinaria* 45: 17-24.
- Jiménez C et al (1991). Congelación de embriones de ratón de ocho células con dos métodos de remoción del crioprotector. *Acovez* 15(1): 19-22.
- Lenis Y (2009). Efecto de la osmolaridad sobre el diámetro y la calidad de oocitos bovinos madurados in vitro. *Rev Lasallista Invest* 6(1): 58-66.
- Olivera M (2003). Producción de embriones F1 BON, para la caracterización del doble propósito y como apoyo a las cadenas láctea y cárnica. *Rev Col Cienc Pec* 16(1): 78-82.
- Olivera M (2005). Cinética de producción de H₂O₂ en embriones bovinos producidos in vitro y su efecto sobre actividad mitocondrial. *Redvet* 6(5): 50522-50523.
- Olivera M (2009). Efecto de la suplementación del medio de maduración con ácido linoléico sobre las tasas de clivaje en embriones bovinos producidos in vitro. *Rev Col Cienc Pec* 22(3): 386-386.
- Olivera M et al (2008). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Rev Col Cienc* 21(3): 398-405.
- Olivera M y Berdugo J (1990a). Obtención y clasificación de oocitos bovinos para el programa de fertilización in vitro. *Acovez* 14(3): 22-26.
- Olivera M y Berdugo J (1990b). Obtención, evaluación y maduración in vitro de oocitos porcinos. *Acovez* 14(1): 13-17.
- Olivera M y Serrano C (2003). Determinación del ciclo celular de embriones bovinos producidos in vitro. *Taurus* 5(20): 20-35.
- Olivera M y Sierra R (2000). Interacción entre gametos: ¿el espermatozoide cómo lo logra? *Anim Reprod Sci* 13(2): 143-147.
- Olivera M y Tarazona A (2003a). Actividad mitocondrial en blastocistos bovinos cultivados in-vitro. *Rev Col Cienc Pec* 16(3): 30.
- Olivera M y Tarazona A (2003b). Actividad mitocondrial en células de la corona radiada de oocitos caninos. *Rev Col Cienc Pec* 16(3): 30.
- Serrano C et al (2002). Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Rev Col Cienc Pec* 15(3): 286-292.
- Sierra RA et al (2000). Selección, cultivo y agrupamiento de embriones bovinos. *Rev Col Cienc Pec* 13(2): 143-147.
- Tarazona A et al (2005). Relationship between mitochondrial activity, endogen hydrogen peroxide and apoptosis in oocytes competent and non-competent early bovine in vitro produced embryos. *Biol reprod* 72(3):152-152.
- Tarazona A et al (2006). Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Domestic Anim* 45(1): 5-11.
- Tarazona A et al (2007a). Criopreservación de oocitos y embriones: Parte I: Propiedades criológicas de los fluidos. *Rev Col Cienc Pec* 19(1): 100-109.

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