



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES OVINOS
Manual de procedimientos

por

Marcela SOUZA NEVES

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

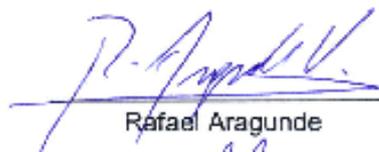
ORIENTACIÓN: Producción Animal
MODALIDAD: Revisión Monográfica

MONTEVIDEO
URUGUAY
2019

PAGINA DE APROBACION

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:


Rafael Aragunde

Segundo miembro (Tutor):


Alejo Menchaca

Tercer miembro:


Sergio Kmaid

Fecha: 23/12/2019

Autor:


Marcela Souza Neves

AGRADECIMIENTOS

A esta casa de estudios, gracias por todas las enseñanzas que van mucho más allá de lo académico y me han formado como persona.

A mi familia por todo el apoyo durante todos estos años de estudio, principalmente a mi madre una persona excepcional que me ha acompañado incondicionalmente, a mi hermana mi fiel compañera y a mi querida abuela que aunque ya no está entre nosotros, pero su apoyo fue fundamental para que culmine esta carrera.

A mis amigos que siempre están presentes y a todos los que pude conocer a lo largo de estos años.

A mi tutor Alejo Menchaca por todo el apoyo, el conocimiento brindado, las oportunidades e incentivar

A todo el equipo IRAUy principalmente a Federico Cuadro y Richard Núñez, y en especial a Pedro Claudino quién dedicó su tiempo en brindarme conocimientos gracias por todas las enseñanzas; compañeros de trabajo y amigos con quienes siempre pude contar.

A Martina Crispo y la UATE por todo el aporte y apoyo en mi formación técnica y académica en este período.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMEN.....	13
SUMMARY	14
1. INTRODUCCION	15
2. OBJETIVO.....	17
3. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	18
3.1. PRODUCCION <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES.....	18
3.1.1. COLECTA DE OVOCITOS.....	18
3.1.1.1. Ovarios de matadero	18
3.1.1.2. Técnica de aspiración folicular por laparoscopia.....	20
3.1.2. MADURACION <i>IN VITRO</i>	21
3.1.2.1. Sistemas de cultivo y la maduración <i>in vitro</i>	22
3.1.2.2. Rol de las hormonas y factores de crecimiento.....	24
3.1.2.3. Rol de las vitaminas	25
3.1.2.4. Rol de la albúmina sérica bovina, sueros y fluido folicular	25
3.1.3. FERTILIZACION <i>IN VITRO</i>	26
3.1.3.1. Selección espermática.....	27
3.1.3.1.1. Técnica de <i>Swim up</i>	28
3.1.3.1.2. Gradiente de densidad discontinuo en Percoll	28
3.1.3.1.3. Lavado de esperma y centrifugación	29
3.1.3.2. Capacitación espermática	30
3.1.3.2.1. Rol del suero de oveja en estro	30
3.1.3.2.2. Rol de la heparina	31
3.1.3.2.3. Efecto del medio en la capacitación.....	32
3.1.3.3. Sistemas de cultivo y la fertilización <i>in vitro</i>	33
3.1.3.3.1. Rol células del <i>cumulus</i>	33
3.1.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	34
3.1.4.1. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	35
3.1.4.1.1. Sistema de cultivo <i>in vitro</i> indefinido	35

3.1.4.1.2. Sistema de cultivo <i>in vitro</i> semi-definido o definido.....	36
3.1.4.1.3 Sistema de cultivo <i>in vitro</i> secuencial	37
3.1.4.2. Condiciones de cultivo.....	37
3.2. CONCLUSIONES	39
3. PROCEDIMIENTOS DE LA PRODUCCION <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES OVINOS	40
4.1. COLECTA DE COMPLEJOS OVOCITOS-CELULAS DEL <i>CUMULUS</i>	41
4.1.1. TECNICA DE ASPIRACION FOLICULAR POR LAPAROSCOPIA.....	41
4.1.1.1. Protocolo sincronización y superovulación	41
4.1.1.2. Preparación de donantes.....	42
4.1.1.3. Aspiración folicular	42
4.1.2. COLECTA DE OVARIOS DE MATADERO.....	45
4.1.2.1. Colecta ovarios.....	45
4.1.2.2. Punción de ovarios y recuperación de complejos ovocitos-células del <i>cumulus</i>	45
4.1.3. MANIPULACION DE OVOCITOS Y EMBRIONES	47
4.1.3.1. Elaboración de capilares para manipulación de ovocitos y embriones.....	47
4.1.3.2. Manipulación de ovocitos/embriones	48
4.1.4. BUSQUEDA Y CLASIFICACION DE COMPLEJOS OVOCITOS-CELULAS DEL <i>CUMULUS</i>	49
4.1.4.1. Búsqueda y clasificación de complejos ovocitos-células del <i>cumulus</i>	50
4.1.4.2. Lavado de complejos ovocitos-células del <i>cumulus</i> en medio de Búsqueda.....	52
4.2. MADURACION <i>IN VITRO</i>	53
4.2.1. Lavado de complejos ovocitos-células del <i>cumulus</i> en medio de Maduración y trasferencia a placa de maduración <i>in vitro</i>	53
4.3. FERTILIZACION <i>IN VITRO</i>	55
4.3.1 Lavado de complejos ovocitos-células del <i>cumulus</i> en medio de Fertilización y transferencia a la placa de fertilización <i>in vitro</i>	55
4.3.2. Preparación del semen e inseminación	57
4.3.2.1. Congelación de semen	57
4.3.2.2. Descongelación de semen y evaluación pos descongelado	58
4.3.2.3. Selección espermática: método de <i>Swim up</i>	58
4.3.2.4. Evaluación de esperma	59
4.3.2.5. Concentración espermática, cálculo de dosis e inseminación.....	60
4.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	61
4.4.1. Remoción de células del <i>cumulus</i>	61
4.4.2. Lavado de cigotos en medio de Desarrollo y transferencia a placa de cultivo <i>in vitro</i>	62

4.4.3. Cámara de trigas e incubación	63
4.4.4. Evaluación de embriones	64
4.4.5. Cambio de medio	68
4.5. REGISTROS.....	69
4.6. ELABORACION DE MEDIOS DE CULTIVO	71
4.6.1.1. Preparación medio de Recuperación.....	71
4.6.1.2. Preparación medio de Búsqueda.....	72
4.6.1.3. Preparación medio de Maduración	72
4.6.1.4. Preparación medio de Fertilización.....	73
4.6.1.5. Preparación medio de Desarrollo	74
4.6.2. Preparación de placas de cultivo	75
4.6.3. Soluciones stock	76
4.6.3.1. Preparación stock A	76
4.6.3.2. Preparación stock B	77
4.6.3.3. Preparación stock C	77
4.6.3.4. Preparación stock D	77
4.6.4. Almacenamiento/Alícuotas	78
4.6.4.1. Antibióticos.....	78
4.6.4.1.1. Penicilina G frigorífico.....	78
4.6.4.1.2. Penicilina-estreptomicina para medios de Recuperación, Búsqueda y Maduración	78
4.6.4.2. Cisteamina	79
4.6.4.3. Heparina.....	79
4.6.4.4. Hipotaurina.....	79
4.6.4.5. Hormonas.....	80
4.6.4.5.1. FSH.....	80
4.6.4.5.2. LH.....	80
4.6.4.6. Buffer fosfato salino.....	81
4.6.4.7. Sueros.....	81
4.6.4.7.1. Suero fetal bovino.....	81
4.6.4.7.2. Suero de oveja en estro.....	82
5. EVALUACION DE EMBRIONES	84
5.1. Estadío de desarrollo embrionario	84
5.2. Calidad embrionaria	86
5.3. Guía de evaluación embrionaria: ejemplos de estadíos de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos (Fuente: Stringfellow DA y Seidel SM, 1998).....	87

6. RECOMENDACIONES GENERALES.....	91
6.1. Higiene general y control de calidad: buenas prácticas en un laboratorio de producción de embriones.....	91
6.1.1. Higiene en el laboratorio.....	91
6.1.2. Higiene del embrión.....	93
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	96
8. ANEXO	107

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP cíclico: adenosín monofosfato cíclico

BEM: solución de aminoácidos esenciales

BSA: albúmina sérica bovina, del inglés *bovine serum albumin*

CaCl₂·2H₂O: cloruro de calcio dihidratado

CIV: cultivo *in vitro*

CO₂: dióxido de carbono

COCs: complejos ovocitos- células del *cumulus*

CRISPR/Cas 9: del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; endonucleasa Cas9.

eCG: gonadotropina coriónica equina, del inglés *equine chorionic gonadotropin*

EGF: factor de crecimiento epidérmico, del inglés *epidermal growth factor*

FF: fluido folicular

FIV: fertilización *in vitro*

FSH: hormona folículo estimulante, del inglés *follicle stimulating hormone*

GH: hormona de crecimiento, del inglés *growth hormone*

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina, del inglés *gonadotropin releasing hormone*

GV: vesícula germinal, del inglés *germinal vesicle*

GVBD: ruptura de la vesícula germinal, del inglés *germinal vesicle breakdown*

hCG: gonadotropina coriónica humana, del inglés *human chorionic gonadotropin*

HEPES: del inglés, *4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid*

IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo-I, del inglés *insulin like growth factor*

KCl: cloruro de potasio

KH₂PO₄: fosfato monopotásico

LH: hormona luteinizante, del inglés *luteinizing hormone*

LOPU: aspiración folicular por laparoscopia, del inglés *laparoscopic ovum pick-up*

MEM: solución de aminoácidos no esenciales

MgSO₄·7H₂O: sulfato de magnesio

MIV: maduración *in vitro*

NaCl: cloruro de sodio

NaHCO₃: bicarbonato de sodio

Na₂HPO₄: fosfato de sodio dibásico

O₂: oxígeno

PBS: buffer fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*

PGF₂α: prostaglandina F₂α

PIVE: producción *in vitro* de embriones

SFB: suero fetal bovino

SOE: suero de oveja en estro

SOF: fluido oviductal sintético, del inglés *synthetic oviductal fluid*

TCM 199: del inglés *tissue culture media*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de reanudación de la meiosis. GV arrest, el ovocito con GV está en arresto meiótico en la profase de la meiosis I; GVBD, ruptura de la vesícula germinal; MI, metafase I; AI, anafase I; MII, metafase II. Fuente: adaptado de Wang y col. (2011).....	22
Figura 2 Técnica de separación espermática en gradiente de densidad discontinuo en Percoll. Fuente: Parrish y col. (1995).	29
Figura 3 Modelo propuesto de los eventos intracelulares durante la capacitación de esperma bovino con heparina. Fuente: Parrish (2014).....	31
Figura 4 Esquema de pasos de la PIVE.	40
Figura 5 Protocolo de sincronización y superovulación. El tratamiento de sincronización de la ovulación se realiza utilizando el protocolo Día 0 (Menchaca y col., 2010) mientras que el tratamiento de superovulación se realiza el día 0 con una dosis única de FSH reconstruida en ácido hialurónico, la progesterona se administra utilizando dispositivo intravaginal (DICO) desde el día 0 al día 3 El día 3 se realiza la LOPU. Fuente: adaptado de Cuadro F (2018).....	42
Figura 6 COCs obtenidos por la técnica de LOPU. Figura 6. Complejos ovocitos-células del <i>cumulus</i> obtenidos por la técnica de aspiración folicular por laparoscopia. A. Ovocitos grado 1. B. Ovocitos grado 2. C Ovocitos grado 3. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (40x).....	44
Figura 7 Fotografías de LOPU.....	44
Figura 8 Fotografía de ovarios ovinos.	46
Figura 9 Fotografías de punción y aspiración de ovario. A, B y C: secuencia de punción y aspiración de ovario.	47
Figura 10 Fotografía de precalentado de capilar.	47
Figura 11 Fotografías de secuencia de elaboración de capilar para manipulación. A: calentando capilar de vidrio en zona en la llama del mechero. B: estirando el capilar con pinza.	48
Figura 12 Fotografía realizando corte de capilar.	48
Figura 13 Fotografía de capilar colocado en tubuladura listo para ser utilizado para la manipulación de ovocitos/embriones. Tubo de capilares de microhematocrito de vidrio sin heparina, pinza y cortador para capilares.....	49
Figura 14 Capilar con burbujas de aire entre el medio de manipulación. En el ejemplo se están manipulando COCs.	49
Figura 15 Esquema de organización del material para la búsqueda de COCs en el laboratorio. Platina encendida a 37°C, placa de Búsqueda, tapa de placa cuadrículada, placa de recuperación, tubo Falcon con medio de Búsqueda y tubo Falcon con líquido folicular.	50
Figura 16 Esquema para realizar la búsqueda de COCs bajo la lupa. Placa de búsqueda 90 mm sobre tapa cuadrículada. Guarda griega indicando el sentido de la búsqueda de COCs.	50

Figura 17 COCs obtenidos por punción y aspiración folicular de ovarios ovinos de hembras de matadero. A. Ovocitos grado 1. B. Ovocitos grado 2. C Ovocitos grado 3. Fotografías tomadas con lupa estereoscópica (50x).	51
Figura 18 COCs de calidad A y B seleccionados para la MIV. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (40x).....	52
Figura 19 Placa de lavado en medio de Búsqueda. Gota de 200 µl y gotas de lavado de 30 µl conteniendo COCs seleccionados en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.....	52
Figura 20 Placa de lavado en medio de Maduración. Gota de 200 µl y gotas de lavado de 30 µl conteniendo COCs seleccionados en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.....	53
Figura 21 Transferencia de COCs seleccionados de la placa de lavado en medio de maduración a la placa de MIV.Figura 21.	54
Figura 22 Fotografía de COCs maduros. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (50x).	54
Figura 23 Transferencia de COCs maduros de la placa de MIV a la placa de lavado en medio de Fertilización.....	56
Figura 24 Placa de lavado en medio de Fertilización. Gota de 200 µl y gotas de lavado de 30 µl conteniendo COCs maduros en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.....	56
Figura 25 Transferencia de COCs maduros de la placa de lavado en medio de Fertilización a la placa de FIV.....	56
Figura 26 Esquema de descongelación de semen.....	58
Figura 27 Depósito de esperma en tubo de <i>Swim up</i>	59
Figura 28 Tubo de <i>Swim up</i> con inclinación de 45° para incubación.....	59
Figura 29 Retirado del sobrenadante con la fracción motil luego del <i>Swim up</i>	59
Figura 30 Esquema de cámara de Neubauer.....	60
Figura 31 Gota de remoción de las células del <i>cumulus</i>	61
Figura 32 Transferencia de los presuntivos cigotos de la placa de FIV a la placa de remoción de células del <i>cumulus</i>	62
Figura 33 Remoción de células del <i>cumulus</i>	62
Figura 34 Placa de lavado en medio de Desarrollo. Gota de 200 µl y gotas de lavado de 30 µl conteniendo los presuntivos cigotos en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.....	63
Figura 35 Transferencia de los presuntivos cigotos de la placa de lavado en medio de Desarrollo a la placa de CIV.	63
Figura 36 Fotografía cámara de trigas.	64
Figura 37 Fotografía de embriones evaluados al día 2. Embriones con divisiones celulares y ovocitos no fertilizados (UFOs). Fotografía tomada con lupa estereoscópica (50x).	65
Figura 38 Fotografía de embriones evaluados al día 6. Mórulas. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (40x).....	65
Figura 39 Fotografía de embriones evaluados al día 6.Figura 39. Blastocistos expandidos. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (50x)	66

Figura 40 Fotografías de embriones evaluados al día 8. A. blastocistos en eclosión. B. blastocisto eclosionado. Fotografías tomadas con lupa estereoscópica (50x).....	67
Figura 41 Fotografías de diferentes estadios de desarrollo embrionario. A. embriones clivados. B. blastocisto expandido. C. blastocisto comenzando el proceso de eclosión. D. blastocisto en eclosión. E blastocisto eclosionado. Fotografías tomadas con microscopio (100 y 400x).	67
Figura 42 Cambio parcial de 80% del volumen de medio de la gota de cultivo.....	68
Figura 43 Planilla de registros de PIVE en ovinos.....	70
Figura 44 Esquema de preparación de placas de cultivo.	75
Figura 45 Códigos numéricos para las diferentes etapas de desarrollo embrionario. La numeración corresponde a los códigos de estadio de desarrollo embrionario en bovinos, considerando los días después de la FIV en que se esperan encontrar. Fuente: Stringfellow DA y Seidel SM (1998).....	85
Figura 46 Guía de evaluación embrionaria: estadios de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos. Parte A.	87
Figura 47 Guía de evaluación embrionaria: estadios de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos. Parte B.	88
Figura 48 Guía de evaluación embrionaria: estadios de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos. Parte C.	89

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de los principales aspectos de la producción *in vitro* de embriones en ovinos y generar un documento apropiado describiendo los procedimientos técnicos para implementar la técnica en laboratorios de reproducción asistida. Como parte de la tercera generación de las técnicas de reproducción asistida, la producción *in vitro* de embriones implica la ejecución de cuatro pasos principales: la colecta de ovocitos obtenidos a partir de folículos antrales utilizando la técnica de laparoscopia o a partir de ovarios de matadero, la maduración *in vitro* de esos ovocitos, la fertilización *in vitro* de los ovocitos madurados con espermatozoides capacitados y finalmente el cultivo *in vitro* de los presuntivos cigotos hasta el estadio de blastocisto, pudiendo criopreservarse para utilizarse posteriormente o transferirse frescos a receptoras. En este documento se describieron los procedimientos que se realizan en los pasos de la producción *in vitro* de embriones, la elaboración de medios de cultivo específicos para cada etapa, la evaluación embrionaria a partir de las normas de la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria y aspectos a tener en cuenta en un laboratorio de técnicas de reproducción asistida.

SUMMARY

The objective of the present work was to carry out a bibliographic review of the main aspects of *in vitro* embryo production in sheep and to generate an appropriate document describing the technical procedures to implement the technique in assisted reproduction laboratories. As part of the third generation of assisted reproduction techniques, *in vitro* embryo production involves the execution of four main steps: the collection of oocytes obtained from antral follicles using the laparoscopic technique or from slaughterhouse ovaries, the *in vitro* maturation of these oocytes, the *in vitro* fertilization of the oocytes matured with capacitated sperm and finally the *in vitro* culture of presumptive zygotes up to the blastocyst stage, which are able to be cryopreserved for later use or transferred fresh to receptors. This document described the procedures performed in the steps of *in vitro* embryo production, the creation of specific culture media for each stage, embryo evaluation based on the standards of the International Embryo Technology Society and the main aspects to consider in a laboratory of assisted reproduction techniques.

1. INTRODUCCION

La producción ovina en Uruguay y en el mundo tiene un importante rol como proveedora de lana y alimentos esenciales, como carne y productos lácteos. En Uruguay, históricamente tuvo un gran protagonismo en el desarrollo económico y social, se mantuvo como principal rubro proveedor del país, jugando un rol fundamental en el aprovisionamiento de materia prima, base de la industria textil nacional y de las principales fuentes alimenticias que tiene el entorno rural del país hasta el presente. El rubro ovino continúa siendo importante en el sector agropecuario, con una población de 6,4 millones de ovinos (DIEA, 2019) generando mano de obra a lo largo de la cadena agroindustrial que compone este sector, desde el sistema productivo a nivel predial, pasando por consignatarios y rematadores, transportistas, diferentes industrias como peinadurías, frigoríficos y curtiembres, entre otros. Durante el año agrícola 2017/2018, se produjeron 42 mil toneladas de carne ovina y 25,5 mil toneladas de lana en base sucia (DIEA, 2019). Así mismo, el sector depende en gran parte de las condiciones del mercado y la producción ovina presenta altibajos en base a las tendencias. Hoy por hoy, a pesar de que las condiciones de producción no resultan satisfactorias y el rubro se mantiene en niveles mínimos registrados, los precios de las lanas, especialmente las finas y superfinas, han marcado una tendencia clara al alza y las exportaciones de carne ovina han crecido en volumen (OPYPA, 2018), el rubro ovino continúa ubicado en los primeros lugares en exportación de bienes del país, durante el año 2018 se exportaron 29.254 toneladas de lana en base sucia y 15.078 toneladas de peso de canal de carne ovina (DIEA, 2019).

El contexto mundial presenta un incremento sostenido de la demanda y de los precios de la carne ovina, a su vez el mercado de lana exige fibras textiles livianas, suaves y confortables que se obtienen a partir de lanas finas y superfinas. En este sentido, para una mayor competitividad y productividad del rubro, el desarrollo e implementación de las biotecnologías de la reproducción son fundamentales, más allá de la mejora en la eficiencia reproductiva y por ende productivo, permite la implementación de programas de mejoramiento genético, apuntando a una mayor producción de lana y carne de calidad. Existe un fuerte interés por parte de una cantidad de actores e instituciones especializadas que promueven el desarrollo y transferencia de tecnologías en la producción ovina, contribuyendo al desarrollo sostenible del sector.

Los avances en reproducción de animales de interés productivo y la continua investigación científica, han permitido una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la reproducción, en este sentido las técnicas de reproducción asistida (ART) han evolucionado a lo largo de los años dando lugar al surgimiento de nuevas tecnologías. Como parte de la tercera generación de las ART, la PIVE en ovinos implica la ejecución de sucesivos pasos que van desde la colecta de ovocitos hasta la obtención de blastocistos en un ambiente controlado. La PIVE en ovinos permite generar descendencia a partir de la manipulación de gametos de hembras y machos genéticamente superiores, permitiendo la implementación de programas de mejora genética, existe la posibilidad de la utilización de hembras pre-púberes, preñadas o

post-mortem (Cognié y col., 2004). Así mismo, la técnica puede realizarse durante todo el año, inclusive fuera de estación reproductiva (Pugh y col., 1991). En nuestro país, en el año 2011 se reportó por primera vez el nacimiento de corderos a partir de la PIVE (Menchaca y col., 2012). El uso de la técnica ha permitido la investigación básica en reproducción, la fisiología del ovocito y del embrión, que a su vez permiten la investigación en PIVE aplicada en humanos (de Souza-Fabjan y col., 2014). Más allá de estas aplicaciones, también es la base para tecnologías de ingeniería genética tales como la transgénesis (Crispo y col., 2015b) y la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) (Baldassarre y Karatzas, 2003) o técnicas más modernas como la edición génica utilizando el revolucionario sistema CRISPR/Cas 9 (Crispo y col., 2015a) que viene siendo utilizado como base de una línea de investigación en nuestro país.

En el marco del uso creciente de las biotecnologías en reproducción animal y vista la importancia de la PIVE en ovinos con aplicaciones en varios ámbitos, aunque quedan desafíos por delante gracias al aporte de la investigación durante varios años esta herramienta está disponible para ser aplicada. No obstante, se carece de un documento que describa claramente los procedimientos y demás aspectos que engloban la PIVE. En este sentido, la generación de un manual de procedimientos para la PIVE en ovinos aporta a nivel científico tecnológico y agropecuario.

2. OBJETIVO

Realizar una revisión bibliográfica y un manual de procedimientos para la producción *in vitro* de embriones en ovinos.

3. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1. PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES

El método de PIVE en ovinos implica la ejecución de cuatro pasos principales: la colecta de COCs obtenidos a partir de folículos antrales, la maduración *in vitro* de los COCs primarios, la fertilización *in vitro* de los COCs secundarios madurados con espermatozoides capacitados y cultivo *in vitro* de los presuntivos cigotos durante el período de 6-7 días hasta el estadio de blastocisto, pudiendo estos ser transferidos en fresco a hembras receptoras o criopreservarse para un uso posterior (Cognié y col., 2003).

Los primeros animales de granja utilizados en estudios de fertilización *in vitro* en la década del 50' fueron ovinos (Dauzier y col., 1953), luego después surgieron reportes de corderos nacidos luego de la fertilización *in vitro* de ovocitos madurados en forma artificial. En los 90', Czlonkowska y col. (1991) estuvieron entre los primeros en reportar el nacimiento de corderos luego de la maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de embriones tempranos con células del oviducto. En el mismo año se reportó el nacimiento de corderos luego de la maduración y fertilización *in vitro*, utilizando semen congelado y ovocitos obtenidos de hembras fuera de estación reproductiva (Pugh y col., 1991), estos resultados permitieron que la producción de embriones por maduración y fertilización *in vitro* se pudiera realizar durante todo el año.

En el mundo, la PIVE es una actividad que viene teniendo un rápido crecimiento en ganado bovino pero es prácticamente inexistente en pequeños rumiantes. A su vez existen relativamente pocos grupos de investigación trabajando en la producción de embriones en pequeños rumiantes en comparación a otras especies como bovinos y porcinos. Aunque la técnica requiere de algunos ajustes los últimos avances han logrado mejorar la técnica y los métodos actuales de MIV, FIV y CIV logran tasas aceptables de producción de blastocistos. Existen excelentes revisiones que abordan la PIVE (Paramio e Izquierdo, 2014; Cognié y col., 2004; de Souza-Fabjan y col., 2014) brevemente se revisaran los pasos PIVE, abordando los puntos principales.

3.1.1. COLECTA DE OVOCITOS

Tanto para investigación como para la aplicación comercial, el éxito de un programa de producción *in vitro* de embriones dependerá en gran parte de la disponibilidad de ovocitos de buena calidad. A su vez, los métodos adoptados para la recuperación de ovocitos dependerán de la fuente de la cual provengan, ya sea de ovarios de matadero o a partir de animales vivos.

3.1.1.1. Ovarios de matadero

Los ovarios de matadero proveen una gran cantidad de ovocitos, en forma continua, manteniendo bajos los costos, por lo que generalmente son la fuente de elección para fines de investigación. La recuperación de ovocitos puede realizarse mediante a) la disección de folículos; b) la técnica de *slicing*; c) o aspiración folicular.

La disección de folículos antrales intactos y la posterior ruptura controlada, fue utilizada por investigadores para poder aplicar la técnica de maduración *in vitro* en ovinos en sus comienzos por los años 80' (Cran y col., 1994). Por otra parte, la técnica de *slicing* involucra la realización de cortes y disección que generalmente se realiza directamente sobre los ovarios, pudiendo realizarse también luego de realizada la aspiración completa de folículos o en combinación con la aspiración de estos.

Por último, la recuperación por aspiración de folículos es el método más utilizado comúnmente, este procedimiento puede realizarse utilizando aguja y jeringa, o aguja de aspiración bajo presión de vacío. La eficiencia de la técnica dependerá del diámetro de la aguja y además la presión de vacío utilizada. Visto que la integridad de los COCs se basa en la densidad de las células del *cumulus* y la homogeneidad del citoplasma, siendo estos los principales criterios morfológicos de selección de los ovocitos inmaduros, así como también estas células juegan un rol importante durante el proceso de maduración *in vitro* (Fry y col., 1997), es sumamente importante respetar la integridad de los COCs en la etapa de recuperación. Algunos estudios han demostrado que a medida que se aumenta la presión de aspiración, se obtiene una mayor cantidad total de ovocitos recuperados pero a su vez se reduce la cantidad de ovocitos viables (Udy y col., 1994; Morton y col., 2008) como resultado de la remoción de las células del *cumulus* y deformación de la zona pelúcida por la presión ejercida (Udy y col., 1994). En ovinos, se demostró que diferentes presiones de vacío afectan tanto la recuperación de ovocitos como la producción *in vitro* de embriones y que ambos métodos resultaron equivalentes en términos de eficiencia, utilizando un mismo diámetro de aguja para ambos y una determinada presión (Cognie, 1999).

En términos generales, la obtención de ovocitos a partir de ovarios de matadero por aspiración o la disección de folículos antrales proporciona entre 1,5 a 2 COCs utilizables por ovario de oveja, mientras que la técnica de *slicing* es un método más eficiente para recuperar un alto número de COCs (6 COCs/ovario), pero esta diferencia en cantidad se atribuye a ovocitos provenientes de folículos pequeños y estos son menos competentes en términos de desarrollo luego de la fertilización (Pawshe y col., 1994; Keskinetepe y col., 1994).

Cuando se trabaja con ovarios de matadero, es importante tener en cuenta las variables tiempo y temperatura desde que se obtienen los ovarios hasta el comienzo de la maduración, ya que estas inciden directamente en el resultado global de la PIVE. Generalmente los ovarios son transportados en una solución salina a una temperatura entre 30 y 35°C (Pugh y col., 1991), a 20°C (Slavik y col., 1992) o a temperatura ambiente (Watson y col., 1994), y el intervalo de tiempo desde el sacrificio de los animales hasta la recuperación de los ovocitos es de 1-2 h (Pugh y col., 1991) hasta 3-4 h (Wani y col., 1999), sin que se vea afectada la maduración *in vitro* de los ovocitos. En bovinos se reportó que la competencia ovocitaria pudo mejorarse manteniendo los ovarios en ciertas condiciones de incubación durante algunas horas (30°C durante 3-4 h) previo a la recuperación de los ovocitos (Sirard y Blondin, 1996), los autores sugirieron que el período de 4 h después del sacrificio podría haber creado un

microambiente folicular específico en el que se produjeron cambios en el ovocito similares a los que normalmente ocurren en el folículo preovulatorio en las horas previas a la ovulación.

3.1.1.2. Técnica de aspiración folicular por laparoscopia

Descrita detalladamente por Tervit y col. (1992) y Baldassarre y col. (1994), la LOPU es la técnica de elección en pequeños rumiantes para la obtención de ovocitos de hembras vivas. Además es una herramienta de apoyo para la implementación de programas de PIVE con fines de mejoramiento genético, ya que permite maximizar la recolección de ovocitos de hembras genéticamente superiores.

El equipo de laparoscopia consta básicamente de un telescopio y fuente de luz, un fórceps atraumático y tres trócares: uno para el laparoscopio, otro para el fórceps y otro conectado a una pipeta para la aspiración. La pipeta de aspiración consiste en una aguja de bisel corto colocada en una pipeta de plástico, conectada a un tubo de recolección y una bomba de vacío. Durante el procedimiento el animal donante permanece en decúbito dorsal sobre una camilla estándar de laparoscopia, bajo anestesia general. Se insertan los tres trócares y una vez en la cavidad abdominal, la superficie ovárica es expuesta mediante la observación laparoscópica. La punción de los folículos se lleva a cabo utilizando la pipeta de aspiración, de manera tal que la aguja entre de costado en forma paralela a la base del folículo o en todo caso en forma perpendicular, una vez dentro del folículo se trata de girar suavemente para asegurar que la mayor parte del contenido del folículo sea aspirado. Con un equipo de operadores con experiencia, el procedimiento tiene una duración de aproximadamente 20 minutos por donadora (Baldassarre y col., 2004).

Dentro de las aplicaciones de la técnica de LOPU, una de las ventajas para la PIVE es que el procedimiento puede realizarse repetidamente en una misma hembra ya que es menos traumático para el animal en comparación a la laparotomía (Baldassarre y col., 2004). Además el procedimiento puede realizarse con un intervalo de 4 días entre aspiraciones sin afectar la recuperación y calidad de los ovocitos (Gibbons y col., 2007). Así mismo está la posibilidad de producir descendencia a partir de hembras pre-púberes, permitiendo como gran ventaja reducir el intervalo generacional, acelerando aún más el proceso de mejoramiento genético (Paramio, 2010; Baldassarre y col., 2004). También ha sido propuesta como una herramienta de apoyo en los avances en ingeniería genética en pequeños rumiantes (Menchaca y col., 2016a).

Como se mencionó anteriormente es fundamental respetar la integridad de la estructura de los COCs y optimizar la tasa de recuperación de estos durante el procedimiento de LOPU, en este sentido se sabe que el material utilizado y las condiciones de aspiración influyen sobre estos factores (Rodríguez y col., 2006). En general, el diámetro de la aguja utilizada varía de 16 a 21 G y la presión de vacío entre 25 a 70 mm Hg. En estas condiciones, el porcentaje de recuperación de ovocitos oscila entre 40% y 90%, a su vez el número de estructuras recuperadas frecuentemente es

alrededor de 12 a 13 ovocitos por hembra (Cognié y col., 2004; Cox y Alfaro, 2007; Morton y col., 2007).

Para recuperar una mayor cantidad de COCs de buena calidad, es necesario realizar la sincronización y estimulación ovárica con gonadotrofinas. Para la sincronización, se han utilizado diferentes protocolos y la mayoría se basan en tratamientos de sincronización del estro con dispositivos intravaginales de progesterona. En general, los dispositivos se aplican por un período de 9-11 días y se aplica una dosis luteolítica de PGF₂ α o un análogo al inicio del tratamiento con gonadotrofina. Otros tratamientos han sido propuestos para la estimulación folicular previa a la LOPU, los más comúnmente utilizados son la múltiple inyección con FSH y el régimen de una sola dosis que consiste en la inyección de una dosis de FSH y eCG (Baldassarre y col., 2002).

Para la manipulación del crecimiento folicular, los nuevos protocolos diseñados tienen en cuenta la necesidad de obtener un grupo homogéneo de folículos medianos (~4 mm) y que estén en fase de crecimiento o estática al momento de la LOPU, conteniendo ovocitos sanos para la PIVE. El protocolo del Día 0 es utilizado para la estimulación de la primera onda folicular, para la superovulación en la producción de embriones convencionales o programas múltiple ovulación y transferencia embrionaria (MOET) (Menchaca y col., 2010), este protocolo sincroniza la ovulación (definida como el Día 0 del ciclo). En el caso de LOPU, puede asociarse este protocolo utilizando una sola dosis de FSH reconstituida en ácido hialurónico (MAP-5, Vetoquinol) el día 0 y la LOPU se realiza 72 h después. Esta combinación ha mostrado mejores resultados, con un mayor número de folículos aspirados y ovocitos recuperados (Menchaca y col., 2016b).

3.1.2. MADURACION *IN VITRO*

A lo largo de la foliculogénesis, el ovocito sufre un progresivo proceso de preparación en el cual se vuelve competente (Sirard y col., 2006). La maduración comienza horas antes de la ovulación en el folículo preovulatorio, donde el ovocito que se encuentra en dictioteno (arresto meiótico) debido al ambiente folicular, reanuda la meiosis, progresando de la profase I a la metafase II, en respuesta a las señales asociadas al pico preovulatorio de LH (Gordon, 2003). Este proceso está coordinado por el ambiente folicular, mediado por el fluido folicular y la interacción con las células del *cumulus* a través de las uniones gap (Mermillod P, 2008). En la maduración del ovocito se producen una serie de complejas modificaciones en el citoplasma, junto a la maduración meiótica del núcleo que incluye la extrusión del primer cuerpo polar durante la transición al estadio de metafase II (figura 1), cambios en la membrana y en las células del *cumulus* que van acompañados de cambios bioquímicos y moleculares (Thibault y col., 1987). Estas modificaciones preparan al ovocito para poder ser fecundado con éxito y mantener la primera fase de desarrollo embrionario.

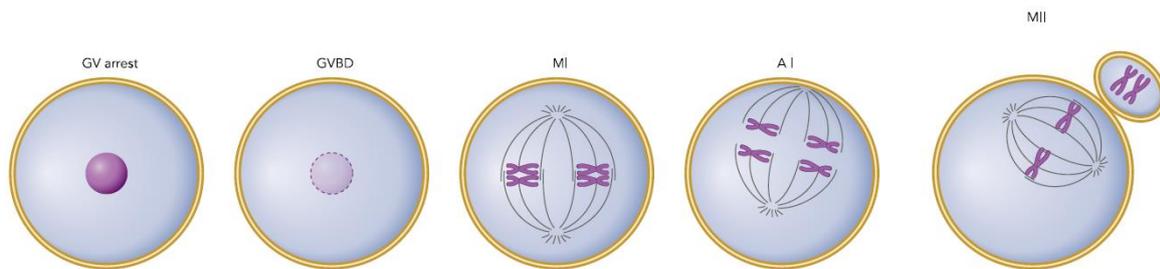


Figura 1 Esquema de reanudación de la meiosis. GV arrest, el ovocito con GV está en arresto meiótico en la profase de la meiosis I; GVBD, ruptura de la vesícula germinal; MI, metafase I; AI, anafase I; MII, metafase II. Fuente: adaptado de Wang y col. (2011).

In vitro, la maduración puede ser iniciada cuando el ovocito completamente desarrollado (competente) es retirado de su ambiente folicular (Gordon, 2003), este fenómeno se busca explorar en los sistemas de cultivo de MIV. La MIV es un paso clave en la PIVE en proporcionar ovocitos de buena calidad para la FIV, a su vez determina el potencial de competencia que tendrán los ovocitos en llevar a cabo el desarrollo embrionario. Una de las grandes limitantes en este paso es la heterogeneidad de los ovocitos obtenidos. La evaluación morfológica de los COCs descrita por Leibfried y First (1979), tiene en cuenta las características de las células *cumulus* y del citoplasma, es un método no invasivo y permite seleccionar un pool de ovocitos homogéneos. Este método es el más comúnmente utilizado para la clasificación de los COCs y se relaciona con la capacidad de desarrollo luego de la FIV (Stojkovic, 2001). No obstante, la evaluación morfológica es subjetiva y dependerá del evaluador. En este sentido, algunos estudios apuntan a la búsqueda de biomarcadores moleculares de calidad de los ovocitos en las células del folículo, como la expresión de las β -timosinas (Salhab, 2010); o en el ovocito, como la tinción con azul de cresil brillante (BCB). La tinción con BCB refleja la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), una enzima sintetizada en ovocitos que están en etapa de crecimiento. Aquellos ovocitos pequeños o en etapa de crecimiento tienen una alta actividad de la G6PDH, por lo que ante la tinción esta enzima reduce el colorante resultando un citoplasma incoloro (BCB-); por otro lado, los ovocitos que han completado la etapa de crecimiento tienen una baja actividad de la enzima y por lo tanto una tinción positiva (BCB+). Esta tinción permite clasificar a los COCs en base a diferentes competencias, pudiendo ser un buen complemento a la evaluación morfológica. Se ha demostrado que aquellos ovocitos BCB+ producen blastocistos con un mayor número de blastómeras (Catalá, 2011). Sin embargo, el número total de blastocistos producidos por ovario es significativamente menor en comparación a la evaluación morfológica debido al bajo número de ovocitos BCB+ por ovario (Paramio e Izquierdo, 2014).

3.1.2.1. Sistemas de cultivo y la maduración *in vitro*

La PIVE se lleva a cabo utilizando diferentes sistemas de cultivo, estos se clasifican según la formulación del medio en: 1) indefinido, en este sistema de cultivo se utiliza suero y/o el co-cultivo con células somáticas; 2) semi-definido, no se utilizan células

somáticas y el suero es reemplazado por BSA; 3) definido, en este sistema la albúmina se reemplaza por macromoléculas, como el alcohol polivinílico (PVA) o la polivinilpirrolidona (PVP) (Vanroose, 2001). A su vez, pueden dividirse en medios simples y complejos. Los medios simples suelen utilizar sistemas tamponados con bicarbonato, contienen solución fisiológica salina básica y la adición de piruvato, lactato y glucosa; las diferencias entre las diversas formas radican en la concentración de iones y en los niveles de la fuente de energía. Generalmente es suplementado con suero o albúmina y antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina). Por otra parte, los medios complejos contienen aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias, en las concentraciones encontradas en el suero, y el nitrógeno fijo en forma de aminoácidos libres; además de los componentes básicos que se encuentran en los medios simples (Gordon, 2003).

El sistema de cultivo podrá ser estático o fluido. Este último implica el cultivo de 20 COCs en un volumen de 2 ml de medio y la adición células del *cumulus*/granulosa, utilizando la agitación con la finalidad de mantener el estado correcto de diferenciación de células somáticas durante el cultivo y para mejorar la calidad de los ovocitos. En general, se utiliza el sistema de cultivo estático, este implica la utilización de gotas de medio de cultivo cubiertas por aceite mineral o de parafina. Como ventajas la utilización de aceite permite minimizar la evaporación de agua, protege contra la contaminación microbiana, permite atenuar las fluctuaciones de temperatura y gases, además facilita la visualización durante el cultivo (Gordon, 2003).

Una variedad de medios han sido propuestos para la MIV en ovinos, tales como Waymouth y Ham-F10. La mayor parte de los laboratorios lleva a cabo la MIV utilizando como base medios de cultivo de tejidos, el más comúnmente utilizado es el TCM 199, enriquecido con aminoácidos, carbono, glucosa, glutamina, vitaminas y minerales en su composición (Mermillod y col., 2006), tamponado o no, con bicarbonato o HEPES. Generalmente suplementado con L-glutamina, piruvato, hormonas gonadotrofinas: FSH (origen porcino u ovino) y LH, y/o esteroideas: 17 β -estradiol, además de la utilización de sustancias complejas como sueros inactivados térmicamente y FF recuperado de folículos sanos no atrésicos (Cognié y col., 2003; Paramio e Izquierdo, 2016). También se ha utilizado el medio SOF en la maduración en lugar del TCM 199 (Shabankareh y col., 2012b).

El sistema empleado para la amortiguación de pH dependerá del grado de exposición al aire o a una atmósfera enriquecida con CO₂. La ventaja de la utilización de medios tamponados es que permiten trabajar por periodos cortos con ovocitos sin la necesidad de CO₂ controlado para mantener un pH relativamente constante. Las condiciones atmosféricas en que se llevan a cabo la MIV son aire y humedad a 39°C con 5% de CO₂. En estas condiciones hay un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cantidades nocivas para los ovocitos. El glutatión (GSH) cumple un importante rol en la prevención del daño oxidativo en las células, además participa en la descondensación espermática en paralelo a la activación del ovocito y en la formación del pronúcleo masculino luego de la fertilización. Los

compuestos tales como cisteamina y el β -mercaptoetanol promueven la síntesis de GSH y consecuentemente disminuyen los niveles de ROS, pero particularmente la cisteamina es un precursor del GSH que agregada al medio de MIV, mejora el desarrollo embrionario y por lo tanto puede ser utilizada para mejorar la eficiencia en la PIVE (de Matos y col., 2002). El efecto de la cisteamina ha sido probado en diferentes medios durante la MIV, en un medio definido los mejores resultados sobre el desarrollo embrionario se obtuvieron agregando 100 μ l de cisteamina (Cognié y col., 2004); por otra lado, utilizando un medio indefinido 200 μ l de cisteamina resultó ser mejor (de Matos y col., 2002). Una alta eficiencia en la PIVE fue reportada utilizando TCM 199 suplementado con BSA, 17 β -estradiol, cisteamina y gonadotrofinas recombinantes en la MIV, resultando en un 42% de blastocistos y entre 52% a 67% de sobrevivencia embrionaria luego de la transferencia (Accardo y col., 2004).

Generalmente el cultivo de los ovocitos en la MIV y en las demás etapas de la PIVE se lleva a cabo en grupos. Sin embargo, en la aplicación comercial de la PIVE en ovinos los ovocitos provienen de animales genéticamente superiores y de gran valor, mediante la aplicación de LOPU por lo se requiere de sistemas de cultivo que sean capaces de llevarse a cabo en forma individual. Respecto al cultivo solo o en grupos, Ward y col. (2000) reportaron que el cultivo individual del ovocito durante la fertilización o el cultivo tuvo un efecto adverso sobre el porcentaje de blastocistos; cuando cultivaron ovocitos en grupos de 5, 10 o 25, no hubo diferencias en el porcentaje de blastocistos entre grupos pero sí en comparación a los que fueron cultivados individualmente (Ward y col., 2000). Generalmente la MIV se lleva a cabo en grupos de 25 a 50 ovocitos, con una proporción de 1 ovocito/2-5 μ l de medio, incubado en atmósfera controlada con 5% de CO₂ en el aire y humedad entre 38 y 39°C durante 24 h (Paramio e Izquierdo, 2014).

3.1.2.2. Rol de las hormonas y factores de crecimiento

Las hormonas gonadotrofinas y el 17 β -estradiol generalmente se utilizan en los protocolos de MIV por sus efectos sobre algunos aspectos de la maduración nuclear y citoplasmática, como la reanudación de la meiosis, así como la expansión de las células del *cumulus* (Gordon, 2003). La utilización del 17 β -estradiol se basa en su presencia en el fluido folicular preovulatorio, sin embargo su efecto es controversial y parece ser dependiente de la presencia o no de otros componentes (Guler y col., 2000). Las concentraciones de FSH, LH y 17 β -estradiol agregadas al medio de MIV varían entre laboratorios, comúnmente se utilizan 10 μ g/ml de FSH, 10 μ g/ml de LH y 1 μ g/ml de 17 β -estradiol (Leoni y col., 2007; Wang y col., 2013); o 5 μ g/ml de FSH, 5 μ g/ml de LH y 1 μ g/ml de 17 β -estradiol (Loi y col., 2008; Catalá y col., 2011). Las hormonas gonadotrofinas hCG y eCG también han sido utilizadas en la MIV (Shabankareh y col., 2012b).

Otros factores hormonales también están involucrados en la maduración meiótica del ovocito durante el período preovulatorio. Como ejemplo, ha sido reportado el efecto positivo de la GH en la maduración nuclear del ovocito influenciado por la presencia

de SFB (Shirazi y col., 2010). Este efecto se vió al agregar 300 ng/ml de GH al medio de MIV suplementado con SFB, aumentando significativamente el posterior desarrollo embrionario. Los factores de crecimiento también han sido utilizados con la finalidad de mejorar los resultados de la MIV. El factor EGF es de los más utilizados, rutinariamente añadido al medio MIV como suplemento (Shabankareh y Akhondi, 2012^a; Wani y col., 2012), este ha sido propuesto como mediador paracrino de las señales de LH durante ovulación en ratones (Park y col., 2004) y el efecto sobre la maduración nuclear y citoplasmática ha sido demostrado en ovinos (Guler y col., 2000). Por otra parte, el factor IGF-I es un conocido regulador del crecimiento celular, la diferenciación y función celular, también ha sido probado para mejorar la maduración de ovocitos en ovinos pero sin ningún efecto positivo (Guler y col., 2000). Shabankareh y Zandi (2010) estudiaron el efecto de la suplementación con EGF, IGF-I y cisteamina en diferentes medios (definido, semi-definido e indefinido) durante la MIV, los resultados demostraron que estos suplementos añadidos al medio indefinido produjeron un mayor porcentaje desarrollo embrionario en comparación al medio definido y semi-definido, aunque la suplementación con estos factores de crecimiento y la cisteamina mejoran la eficiencia del medio definido. Existe una tendencia a optar por la utilización de medios definidos, en este sentido, el TCM 199 suplementado con EGF y cisteamina parece ser una opción que genera buenos resultados (Cognié y col., 2004; Cocero y col., 2011).

3.1.2.3. Rol de las vitaminas

Las vitaminas son componentes comunes de muchos medios definidos. Se ha demostrado que las vitaminas aumentan el metabolismo de la glucosa y poseen un efecto antioxidante en el desarrollo embrionario (Gardner y col., 1994). Los efectos de las vitaminas en los ovocitos han sido probados en la maduración y cultivo embrionario, indicando algunos beneficios para la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario (Shabankareh y Akhondi, 2012a). El medio mínimo esencial (MEM) contiene seis vitaminas solubles en agua (clorhidrato de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxal, ácido fólico, pantotenato de D-calcio y nicotinamida) y dos cuasi-vitaminas (mioinositol y cloruro de colina), a su vez el TCM 199 contiene estas mismas vitaminas. Utilizando medios semi-definidos, la adición de vitaminas mejora el desarrollo embrionario, la adición de BSA y vitaminas presentes en el medio MEM a un medio SOF de maduración aumentan el porcentaje de blastocistos (Shabankareh y col. 2012).

3.1.2.4. Rol de la albúmina sérica bovina, sueros y fluido folicular

La MIV generalmente es suplementada con macromoléculas como la BSA, una fuente de proteínas, catalogada como semi-definida ya que han sido reconocidas impurezas como moléculas de bajo peso molecular en su composición. La suplementación con sustancias complejas como los sueros, proporciona proteínas y factores de crecimiento que contribuyen a la MIV y al posterior desarrollo embrionario, aunque poseen una naturaleza indefinida y variabilidad en la composición. Generalmente se

realiza un tratamiento térmico que consiste en exponer el suero a una temperatura de 56-60°C durante 30 minutos, con la finalidad de inactivar el sistema de complemento que está presente en el suero (Gordon, 2003). Por otra parte, el FF constituye el microambiente del ovocito durante la maduración folicular y contiene moléculas involucradas en la maduración nuclear y citoplasmática, ovulación y fertilización. Estas sustancias generalmente son utilizadas a una concentración entre el 10 y 20%, los más utilizados son el SFB (Wani y col., 2012), el SOE (Shabankareh y col., 2011) y el FF obtenido de folículos grandes (> 4 mm) no atrésicos (Cognié y col., 1995). Al utilizar estas sustancias, se debe tener presente la variabilidad existente entre diferentes fuentes o entre lotes de una misma fuente, además de los riesgos sanitarios existentes. El FF contiene esteroides, glicosaminoglicanos y metabolitos sintetizados por las células de la teca; la utilización de FF en el medio de MIV influye además en la osmolaridad, ya que en el animal vivo este fluido está en contacto con el ovocito, la osmolaridad debería ajustarse entre 270 y 285 mOsM (Gordon, 2003).

En parte las investigaciones en MIV han sido direccionadas a la búsqueda de medios definidos y estandarizados para utilizar en la MIV. Sin embargo, la gran heterogeneidad de los ovocitos obtenidos de LOPU de hembras vivas o a partir de ovarios de matadero ha dificultado esta tarea. La elección del medio a utilizar dependerá de varios factores involucrados, optando por el que mejor se ajuste a las condiciones del laboratorio y logre optimizar la PIVE en forma global. Entre los factores involucrados, el medio en particular depende de la disposición de los materiales necesarios, pero además la labor de preparación de los medios y la frecuencia con la que se realicen, el cuidado la manipulación y el riesgo de degradación de ciertos componentes. Teniendo en cuenta estos factores la utilización de un determinado sistema de medios para la MIV y los siguientes pasos de la PIVE, permite ahorrar compuestos ya que pueden realizarse en base a las mismas soluciones stock. Conocer los límites en los cuales es posible operar dentro de la PIVE permite ingeniar posibles formas de simplificar y optimizar el proceso de producción.

En general, los ovocitos recuperados de hembras adultas pueden cultivarse en un medio de MIV definido o semi-definido como por ejemplo TCM 199 suplementado con EGF y cisteamina. Cuando se utilizan ovocitos recuperados de hembras prepúberes o hembras de descarte por la edad, es necesario un sistema más complejo para la MIV, utilizando un medio indefinido como el TCM 199 suplementado con hormonas, antioxidantes y alguno de los sueros. La calidad del ovocito es la clave para la producción de blastocistos, sin embargo, los eventos que ocurren entre la etapa de cigoto y blastocisto determinan la calidad de estos, que a su vez se ve afectada por las condiciones de cultivo embrionario (Rizos y col., 2002).

3.1.3. FERTILIZACION *IN VITRO*

La fertilización es el proceso de unión de dos células altamente diferenciadas, ovocito y espermatozoide, con dotación cromosómica haploide (n). En este proceso el espermatozoide logra penetrar la zona pelúcida y unirse al ovocito, van a interactuar

y activarse dando lugar a un cigoto con dotación cromosómica diploide (2n). Sin embargo, los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de fertilizar al ovocito inmediatamente después de la eyaculación. Para adquirir esta capacidad, previo a la fertilización, los espermatozoides requieren de un período de incubación en el aparato reproductor femenino, en este período se someten a una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, este es el proceso de capacitación. La capacitación involucra ocurrencia de varios cambios bioquímicos a nivel intracelular y de la membrana plasmática, a nivel molecular hay pérdida de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides, aumento de la fluidez de la membrana y cambios en las concentraciones de iones intracelulares (Visconti y col., 2011), hiperpolarización de la membrana plasmática de los espermatozoides (Hernández-González y col., 2006), aumento de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) (Krapf y col., 2010) y fosforilación de la proteína tirosina (Arcelay y col., 2008). Estos cambios desencadenan la hipermotilidad, la interacción con la zona pelúcida y la reacción acrosómica, fusionándose a la membrana del ovocito mediante la fijación de la cabeza del espermatozoide a los receptores glicoproteicos de la zona pelúcida. Este es un requisito indispensable para la fusión de los gametos, mediante la liberación de enzimas que permiten al espermatozoide el movimiento por la zona pelúcida hasta el interior del ovocito. Inmediatamente es efectuada la fertilización, es producida la reacción cortical en la membrana plasmática del ovocito impidiendo la poliespermia. Cuando se fusionan el ovocito con el espermatozoide se originan los pronúcleos masculino y femenino, y estos migran hacia el centro del ovocito para formar el cigoto, proceso denominado singamia, seguidamente es producida la primera división celular del embrión (Senger, 2003).

In vitro la fertilización requiere de una adecuada selección y capacitación espermática, y además medios de FIV apropiados. Los ovocitos madurados pueden ser fertilizados utilizando semen eyaculado o colectado de la cola del epidídimo, fresco o congelado-descongelado. En cualquiera de los casos el factor determinante está en la selección y capacitación adecuada del semen a utilizar, por lo que, previo a la fertilización propiamente dicha es necesaria la preparación del esperma.

3.1.3.1. Selección espermática

El primer paso en la preparación del esperma a utilizar es la selección de los espermatozoides viables y motiles de la muestra de semen, además, esta se compone de una mezcla de plasma seminal, espermatozoides maduros e inmaduros, otros tipos celulares, microorganismos diversos y artefactos no específicos. Varias técnicas han sido propuestas para la selección espermática, que van desde las más sencillas como el simple lavado y centrifugado de semen a otras más complejas, las más utilizadas son la técnica de *Swim up* y el gradiente de densidad discontinuo en Percoll.

3.1.3.1.1. Técnica de *Swim up*

La técnica de *Swim up*, descrita por Parrish y col., (1986), está basada en la capacidad migratoria de los espermatozoides, en la cual los espermatozoides motiles logran ascender en un medio. Existen diferentes protocolos para llevar a cabo la técnica, en general el procedimiento se lleva a cabo colocando una alícuota de 50 a 200 μ l de semen en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo entre 1 a 2 ml de medio de capacitación, se incuba a 39°C y 5% CO₂ durante 0,5 a 2 h, colocando el tubo en un ángulo de 45°. Luego de la incubación, se retira un volumen de 0,4 a 1,5 ml del sobrenadante conteniendo el pool de espermatozoides, posteriormente se realiza un lavado en el medio de capacitación utilizado y se centrifuga a 200-700 g durante 3 a 10 minutos, este procedimiento se realiza dos veces. Por último, el sedimento final se resuspende en medio de fertilización (Shabankareh y Akhondi, 2012a; Wani y col., 2012; Shirazi y Motaghi, 2013).

3.1.3.1.2. Gradiente de densidad discontinuo en Percoll

La selección espermática por gradiente de Percoll, recupera espermatozoides mediante la centrifugación en un gradiente de densidad discontinuo en Percoll en el cual los espermatozoides motiles se desplazan hasta que son retenidos en la zona de mayor densidad (Heidari y col., 2013; Li y col., 2006; Wan y col., 2009). El Percoll consiste en partículas de sílice coloidales de 15-30 nm diámetro (23% m/m en agua) rodeadas de polivinilpirrolidona, este recubrimiento hace que no sea tóxico y permite utilizarlo con material biológico. Normalmente se utilizan dos densidades de soluciones Percoll, al 45% y 90%. Para realizar el procedimiento, se forma el gradiente depositando la solución de Percoll al 90% en el fondo de un tubo cónico de 15 ml y luego la solución de Percoll al 45% por la pared del tubo, manteniendo la interfase entre las soluciones (figura 2). El volumen utilizado varía entre 1 a 2 ml para cada solución de Percoll. Posteriormente se coloca semen por la pared del tubo, sobre la parte superior de la capa del 45%, luego se centrifuga a 100-700 g a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Una vez culminada la centrifugación, se elimina el sobrenadante y el sedimento resultante se vuelve a suspender en 0,5 a 2 ml de medio de capacitación, volviendo a centrifugarse, este procedimiento se realiza dos veces. El mini-Percoll es un método alternativo al original en el cual se reduce del volumen de Percoll utilizado, el tiempo de centrifugación y aumentando la fuerza con la que se centrifuga, como ventaja la alternativa disminuye los costos y el tiempo de manipulación sin afectar la motilidad espermática utilizando semen congelado (Olivares y col., 2016).

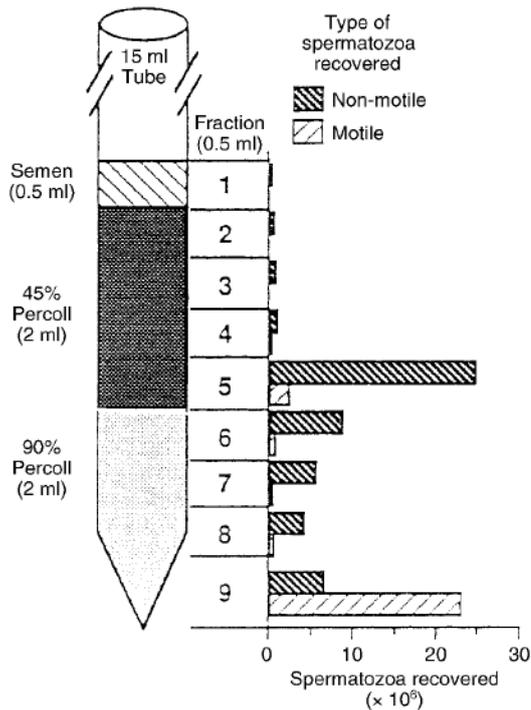


Figura 2 Técnica de separación espermática en gradiente de densidad discontinuo en Percoll. Fuente: Parrish y col. (1995).

Comparando el procedimiento Percoll y la técnica de *Swim up* utilizando semen congelado bovino durante la FIV, se encontró que el procedimiento de Percoll además de ser más rápido, permitió recuperar una mayor cantidad de espermatozoides motiles de una muestra. Sin embargo, los espermatozoides separados por *Swim up* penetraron más ovocitos a la misma concentración de espermatozoides durante la FIV. Los ovocitos penetrados por espermatozoides separados por Percoll aumentaron al aumentar la concentración de espermática durante la FIV. Además, aparentemente no hubo diferencias en la capacidad de desarrollo de los embriones fertilizados por espermatozoides separados por *Swim up* o Percoll (Parrish y col., 1995).

3.1.3.1.3. Lavado de esperma y centrifugación

Otro método propuesto en ovinos para seleccionar espermatozoides motiles de semen fresco o congelado es el simple lavado de esperma y centrifugación (Mara y col., 2013; Cocero y col., 2010; Ptak y col., 1999). El procedimiento se realiza colocando una alícuota de esperma en un tubo cónico de 15 ml conteniendo un volumen de medio de capacitación y se centrifuga a 200 g durante 5 minutos, luego el pellet se resuspende en el mismo volumen utilizado de medio de capacitación y se vuelve a centrifugar. Finalmente el pellet conteniendo los espermatozoides motiles, se agrega directamente al medio de fertilización.

Olivares y col., (2017) compararon estos métodos de selección espermática, donde cuantificaron las tasas de recuperación de esperma de cada método, además de la motilidad, capacitación espermática e integridad de la membrana plasmática, en

diferentes intervalos de incubación. En relación a la motilidad espermática, los tres métodos logran aumentar los parámetros de motilidad analizados inmediatamente después de la selección, a su vez no hubo diferencias entre el *Swim up* o el método con Percoll. En general, los espermatozoides seleccionados por *Swim up* presentaron valores mayores en los parámetros espermáticos evaluados a lo largo de los diferentes intervalos de incubación, lo que indica una mayor duración de la viabilidad de la muestra y una ventaja para la FIV. Además, el método de *Swim up* implica un procedimiento que recupera una fracción espermática limpia sin otros tipos celulares, con alta tasa de espermatozoides motiles con excelente calidad. Por otro lado, el método con Percoll permitió recuperar mayor cantidad de espermatozoides, lo que es una ventaja para la selección utilizando esperma congelado. Además, el método mini-Percoll, resultó similar al método original, siendo una alternativa atractiva para minimizar costos y reducir el contacto con las moléculas de gradiente de densidad.

Diferentes técnicas de selección de espermática han sido propuestas para obtener un procedimiento eficiente que genere una muestra final con excelentes parámetros espermáticos para que la fertilización ocurra exitosamente. A pesar de que el método de *Swim up* logra mejores resultados en los parámetros espermáticos evaluados, los diferentes protocolos de gradiente de densidad discontinuo en Percoll son los más utilizados para la selección durante la preparación de esperma para la FIV, posiblemente debido a su practicidad y velocidad con la que se realiza en comparación con la técnica de *Swim up*.

3.1.3.2. Capacitación espermática

Una vez seleccionados los espermatozoides viables y motiles, se lleva a cabo la capacitación espermática *in vitro*. Los procedimientos de capacitación *in vitro* buscan simular los eventos que ocurren normalmente en el tracto reproductivo de la hembra. Varios agentes capacitantes han sido utilizados logrando buenos resultados en la fertilización y el posterior desarrollo embrionario, el SOE y la heparina, son los principales agentes utilizados en la capacitación espermática.

3.1.3.2.1. Rol del suero de oveja en estro

El SOE es el principal agente capacitante utilizado en ovinos (Berlinguer y col., 2012; Catalá y col., 2011; Wang y col., 2013), la utilización en el medio de cultivo ha sido propuesta por el efecto beneficioso sobre el proceso de capacitación espermática y la fertilización (Crozet y col., 1987; Huneau y col., 1994; Li y col., 2006). El SOE promueve una mayor incidencia de aglutinación de cabezas que está relacionada a una mayor viabilidad espermática (Thompson y Cummins, 1987). Tanto el suero, como en el fluido folicular y del oviducto, naturalmente presentan albúmina, esta proteína con alta capacidad de unión podría contribuir a la salida colesterol de la membrana, favoreciendo la capacitación de los espermatozoides, ya que es una de las principales características de este proceso (Langlais y col., 1988). Además, el uso de SOE en la capacitación parece inhibir las vías apoptóticas, previniendo la activación de las caspasas, asegurando que los espermatozoides mantengan su

competencia fisiológica durante este proceso crítico previo a la fertilización, este hallazgo le asigna un rol importante al SOE en la prevención del deterioro de los espermatozoides (Del Olmo y col., 2016). Para la capacitación espermática se utilizan concentraciones de 20% de SOE para semen fresco (Crozet y col., 1987) o 2% de SOE utilizando semen congelado (O'Brien y col., 1997).

3.1.3.2.2. Rol de la heparina

El uso de la heparina como promotora de la capacitación de los espermatozoides como la fertilización *in vitro* en bovinos va relacionada al posible rol que desempeñan las secreciones de líquido folicular y/o del oviducto en capacitar e inducir la reacción acrosómica. Se sabe que tanto el líquido folicular como el fluido oviductal son ricos en glicosaminoglicanos (GAG) (Lee y Ax, 1984). La heparina es un GAG, cuyo modelo que explica el mecanismo de acción (figura 3) propone que esta se une a proteínas del plasma seminal que están acopladas a la membrana plasmática del espermatozoide, conduciendo a la pérdida de estas junto al colesterol asociado y otros fosfolípidos, esto induce cambios en los niveles de calcio intracelular, pH intracelular y los niveles de AMP cíclico durante la capacitación, que terminan consecuentemente en un aumento en la fosforilación de la proteína tirosina. Los cambios inducidos en la capacitación del espermatozoide permiten que pueda experimentar la reacción acrosómica cuando este se encuentre con la zona pelúcida del ovocito (Parrish, 2014).

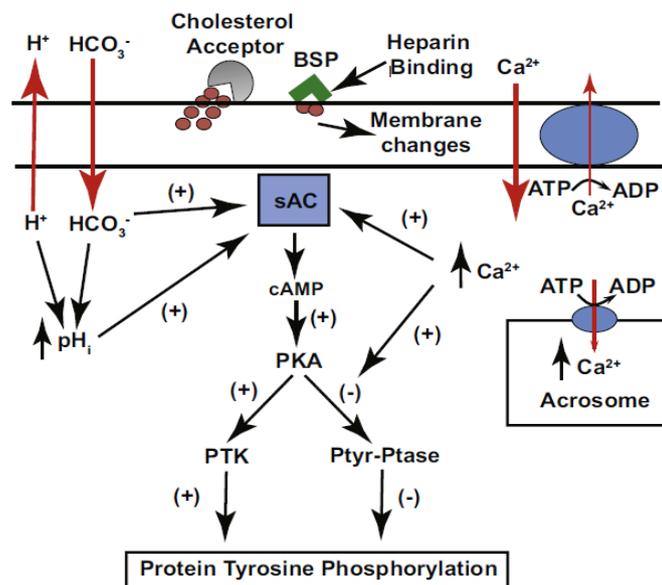


Figura 3 Modelo propuesto de los eventos intracelulares durante la capacitación de espermatozoides bovinos con heparina. Fuente: Parrish (2014).

En cabras, la utilización de heparina como agente capacitante mejoró las tasas de desarrollo embrionario, se obtuvieron mayores cantidades de blastocistos a partir de COCs que fueron fertilizados en presencia de heparina en comparación a COCs fertilizados sin la utilización de esta, sugiriendo que la adición de heparina al medio de fertilización mejora la capacitación espermática utilizando semen congelado (de

Souza y col., 2013). Así mismo, la utilización de heparina en ovinos ha resultado ser beneficiosa (Slavik y col., 1992; Wani y col., 2012; Heidari y col., 2013).

En general, se logran mejores resultados utilizando una combinación de SOE y heparina (Cox y Alfaro, 2007; Cognié y col., 2003) o agregando otras sustancias: heparina y PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) (Shabankareh y Akhondi, 2012a); heparina, PHE y SOE (Wan y col., 2009). La hipotaurina, es un precursor de la taurina, ambos son antioxidantes que normalmente están presentes en los espermatozoides de los mamíferos. Esenciales para las funciones espermáticas como la capacitación, la motilidad, la capacidad de fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Se sabe además, que neutraliza los radicales hidroxilo producidos durante la lipoperoxidación, previniendo el daño de los espermatozoides por estrés oxidativo (Bucak y col., 2013). Utilizando hipotaurina en una combinación con SOE y heparina, tanto para medio de FIV como para preparación de espermatozoides, utilizando semen congelado, se logran % de clivaje a las 48 h en un rango de 80 a 90% en más del 80% de las sesiones de PIV (Menchaca y col., 2016). El uso de penicilamina, hipotaurina y epinefrina, se basa en que la penicilamina puede aumentar la porcentaje de espermatozoides que se somete a la reacción acrosómica utilizado en presencia de epinefrina, también se sabe que la hipotaurina aumenta la motilidad espermática y que una combinación de epinefrina e hipotaurina pueden aumentar la cantidad de ovocitos penetrados por espermatozoides en bovinos (Gordon, 2003). En la búsqueda de agentes más definidos a utilizar en la capacitación, por ejemplo aumentando los niveles de AMP cíclico con dibutilil-cAMP exógeno e inhibidores de la fosfodiesterasa iniciando la fosforilación de tirosina de proteínas flagelares, que está asociada a la capacitación (Colas y col., 2008).

Tanto el SOE como la heparina y los demás agentes capacitantes descritos se utilizan previo a la FIV, incubando los diferentes agentes con los espermatozoides por un período de 15 minutos a 1 hora, y también están presentes en el medio de fertilización.

3.1.3.2.3. Efecto del medio en la capacitación

El lavado de los espermatozoides antes de la incubación utilizando un medio con alto contenido de sales acelera la capacitación *in vitro*, provocando un aumento en la respuesta de acrosoma en los espermatozoides. Poco después de la exposición de los espermatozoides a un medio de alta fuerza iónica, genera un cambio en la motilidad espermática, este cambio refleja un aumento en el metabolismo, relacionado a un aumento en la toma de oxígeno, que se produce en los espermatozoides capacitados *in vivo*. La hiperactivación de los espermatozoides capacitados *in vitro*, aumenta a medida que aumenta el tiempo de incubación y va acompañada de una mayor proporción de espermatozoides con reacción acrosómica. El componente iónico del medio de cultivo influye en la motilidad de los espermatozoides, la capacitación, la integridad acrosómica y en la capacidad de penetrar el ovocito (Wani y col., 2002). El pH del medio afecta la ionización de sustancias dentro del espermatozoide, incluidas las proteínas de la membrana espermática y las proteínas

del plasma seminal que están adheridas. La mayoría de los procedimientos de FIV se llevan a cabo con un pH entre 7.4 y 8.0.

3.1.3.3. Sistemas de cultivo y la fertilización *in vitro*

El éxito de la FIV depende de una adecuada MIV, selección y capacitación espermática, pero además la interacción entre el ovocito y espermatozoides y las condiciones en que se lleva a cabo. En el caso de la FIV se utiliza un sistema de cultivo indefinido, respecto al medio de fertilización, el SOF descrito por Tervit y col. (1972) es el más utilizado en ovinos (Leoni y col. 2007; Menchaca y col., 2016; Wan y col., 2009) con la adición de los agentes capacitantes previamente descritos.

El cultivo se lleva a cabo en grupos de 15 a 30 ovocitos en gotas de 50 a 100 μ l de medio de FIV, donde es realizada la inseminación. Generalmente la concentración final de espermatozoides utilizada en la FIV la gota es de 1×10^6 espermatozoides/ml, pero varía de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml (Bai y col., 2008) a 10×10^6 espermatozoides/ml (Menchaca y col., 2016) dependiendo del carnero del cual provenga el semen y sistema de FIV utilizado. Los espermatozoides y los ovocitos se co-incuban durante 18 a 24 h a 38-39°C. El tiempo de co-incubación fue originalmente fijado por razones prácticas, el tiempo mínimo de co-incubación para alcanzar tasas aceptables de clivaje y desarrollo embrionario es de 9 a 12 h cuando se inseminan ovocitos rodeados por células del *cumulus* (Kochhar y col., 1997), probablemente este tiempo sea necesario para que el espermatozoide logre cruzar las células del *cumulus* y para la cinética de capacitación espermática.

Acerca del ambiente atmosférico utilizado durante la FIV, la mayoría de los laboratorios utiliza una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ (Cognie y col., 2003). Sin embargo, las condiciones del tracto reproductivo de la hembra, dependiendo de la especie, tienen una tensión de O₂ más baja que el aire (Fischer y Bavister, 1993). Buscando simular esas condiciones, Leoni y col. (2007) sugieren que una atmósfera baja en O₂ (5%) durante la FIV aumenta la cantidad de blastocistos de mejor calidad, desde el punto de vista de la cinética de desarrollo embrionario a la etapa de blastocisto (día 6) y criotolerancia a los procedimientos de vitrificación.

3.1.3.3.1. Rol células del *cumulus*

Considerando la interacción de espermatozoides y ovocitos en el oviducto, se sabe que el ovocito es ovulado cubierto de células del *cumulus* expandidas; estas células aparentemente se dispersan en la región ampular del oviducto pocas horas después (Gordon, 2003). Algunos laboratorios remueven las células del *cumulus* de los ovocitos al final de la MIV justo antes de la FIV (Cognié y col., 2004). Chian y col., (1995) presentaron resultados indicando que las células del *cumulus* participan en los mecanismos de capacitación espermática y reacción acrosómica en bovinos, luego después, concluyeron que las células del *cumulus* producen una sustancia química que atrae espermatozoides o facilita la penetración de espermatozoides cuando hay muy pocos espermatozoides alrededor del ovocito. En cabras, se estudió la presencia de

células *cumulus* en el ovocito durante la FIV, la presencia de estas mejoró la tasa de fertilización, mejorando el potencial de desarrollo embrionario posterior. Pero además, se demostró que algunos ovocitos que pierden las células del *cumulus* durante la recolección lograron desarrollarse hasta el estadio de blastocisto cuando fueron madurados y fertilizados en presencia de COCs intactos (de Souza y col., 2013). Menchaca y col., 2012 reportaron un efecto positivo de las células del *cumulus* durante FIV en ovinos, mejorando el porcentaje de clivaje (85 vs. 77) y porcentaje de desarrollo (37 vs. 17) cuando las células del *cumulus* se mantuvieron durante la FIV en comparación a cuando fueron removidas antes de la fertilización, respectivamente ($P < 0.05$).

3.1.4. CULTIVO *IN VITRO*

Luego de la maduración y fertilización *in vitro* del ovocito, el paso final de la PIVE es el cultivo *in vitro* de los presuntivos cigotos durante 6 a 7 días hasta alcanzar la etapa de blastocisto, estadio que puede ser transferido a una receptora o ser criopreservado para almacenarse hasta ser utilizado. Los principales eventos que ocurren en este período son: la primera división celular, la cual se sabe que es de importancia crítica en determinar el desarrollo posterior del embrión; la activación del genoma del embrión que ocurre en la etapa de 8-16 células; compactación de la mórula el día 5, que implica el contacto íntimo entre las células del embrión; y la formación del blastocisto entre los días 6 y 7, que implica la diferenciación de los tipos celulares: las que componen el trofoectodermo y las células que conforman el macizo celular interno (Lonergan y col., 2003). El CIV puede llevarse hasta el día 8 donde ocurre la expansión del blastocisto de manera tal que rompe la zona pelúcida y genera la eclosión. El período de cultivo después de la fertilización es el de mayor impacto en la calidad embrionaria. A pesar de que una mayor cantidad de blastocistos depende de la calidad intrínseca de los ovocitos y las condiciones de maduración, como se mencionó anteriormente la calidad de los blastocistos resultantes dependerá de las condiciones en las cuales se lleve a cabo el desarrollo embrionario (Rizos y col., 2002).

El desarrollo embrionario normalmente ocurre bajo la protección y en el ambiente del tracto reproductivo de la hembra, el cual provee todos los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario temprano. En los mamíferos la composición del ambiente embrionario cambia a lo largo de las divisiones celulares. La activación del genoma embrionario coincide con un aumento en la actividad metabólica (Rieger y col., 1992), consumo de O₂ y carbohidratos (Thompson y col., 1996), hasta el estadio de blastocisto. Por lo cual *in vitro*, el éxito de esta etapa depende de varios factores, ya sean ambientales como la temperatura, pH y concentración de gases; como también del medio de cultivo utilizado como la composición en carbohidratos, proteínas y aminoácidos, lípidos y ácidos grasos, factores crecimiento y citoquinas, la osmolaridad y la composición iónica. Cualquier desviación en el ambiente puede llevar a un bloqueo en cualquiera de las etapas del desarrollo embrionario.

3.1.4.1. Sistemas de cultivo *in vitro*

Los sistemas de cultivo *in vitro* que se utilizan de rutina en el laboratorio son: 1) Indefinido, realizando un co-cultivo con células somáticas; 2) Semi-definido o definido, en un medio con los nutrientes necesarios para soportar los requerimientos del embrión. El desarrollo embrionario también puede llevarse a cabo *in vivo*, realizando la transferencia embrionaria al oviducto de una receptora.

3.1.4.1.1. Sistema de cultivo *in vitro* indefinido

Utilizando los medios de cultivo tradicionales para llevar a cabo el CIV de embriones, se encontró que hay un bloqueo en el desarrollo embrionario luego de 8 a 16 células (activación del genoma). En este sentido, surgió la utilización de SFB y células somáticas en el cultivo. Teniendo en cuenta el importante rol del oviducto en el desarrollo embrionario temprano, Gandolfi y Moor (1987) demostraron que el co-cultivo con células epiteliales del oviducto podría soportar el desarrollo de embriones ovinos más allá de las 8 a 16 células. Desde entonces, muchos laboratorios optan por utilizar estas condiciones de cultivo, especialmente laboratorios que utilizan incubadoras con 20% de O₂. El co-cultivo con células permite reducir la tensión de O₂ a niveles menos tóxicos. Pero además las células del epitelio oviductal utilizadas en co-cultivo producen una variedad de sustancias, entre ellas factores de crecimiento que promuevan el desarrollo embrionario, y además también eliminan factores tóxicos del medio de cultivo (Bavister y col., 1995). En general, el co-cultivo en el CIV se lleva a cabo utilizando medios de cultivo de tejidos, como el TCM 199, que contiene aminoácidos y vitaminas, ambos necesarios para mantener la viabilidad de las células somáticas *in vitro* (Garner y col., 1994), suplementado con 10% de SFB y células del epitelio oviductal (OOEC) (Gandolfi y Moor, 1987). Las células madre mesenquimales (MSC) también han sido propuestas como una nueva fuente de células somáticas en el co-cultivo con embriones (Heidari y col., 2013).

Este sistema de cultivo tiene algunas desventajas, las células somáticas pueden generar variabilidad en la producción de embriones, cuando diferentes tipos celulares son utilizados así como también cuando se utilizan células de diferentes animales. Además existen riesgos de contaminación y la preparación del co-cultivo consume tiempo. Los resultados no son predecibles debido al estado fisiológico desconocido de las células. Por otra parte, la presencia de SFB en el medio de cultivo está asociada a varias anomalías en el desarrollo fetal y nacimiento, como aumento de pérdidas embrionarias tempranas, fetos grandes, crecimiento desproporcionado de órganos fetales y anomalías del desarrollo placentario, mayor incidencia de distocia y mayor mortalidad neonatal, relacionadas a una gestación prolongada (Walker y col., 1998). Así mismo, algunos laboratorios utilizan suero (5 a 10% SFB) como suplemento al medio SOF, suplementando 2 a 3 días luego de la FIV (Cognié, 1999), o también durante todo el CIV en combinación con medio TCM 199 (Wani y col., 2012).

3.1.4.1.2. Sistema de cultivo *in vitro* semi-definido o definido

En general, los medios de cultivo diseñados específicamente para embriones de mamíferos se basan en soluciones salinas equilibradas con la adición de sustratos de energía: piruvato, glucosa y lactato, y se complementan habitualmente con una fuente de proteínas, generalmente se utiliza BSA (Garner y col., 1994).

El sistema de CIV definido fue propuesto para el cultivo de embriones utilizando el medio SOF, donde Tervit y col. (1972) fueron los primeros en reportar el CIV exitoso desde cigotos a la etapa de blastocisto en rumiantes. Originalmente el medio se basó en el análisis bioquímico del fluido oviductal ovino y posteriormente fue modificado por la adición de aminoácidos. Hoy por hoy, el medio SOF comúnmente se utiliza en el sistema semi-definido, suplementado con aminoácidos y BSA, sin la utilización de SFB o células somáticas (Garner y col., 1994). Es frecuente agregar aminoácidos esenciales y no esenciales al medio de cultivo de embriones en base a los protocolos diseñados originalmente para células somáticas, los aminoácidos en el medio de cultivo facilitan el desarrollo embrionario, ayudando a evitar el bloqueo en el desarrollo embrionario inducido por el cultivo (Garner y col., 1994).

En condiciones semi-definidas, la renovación del medio es una práctica frecuente y resulta bastante beneficioso, ya que proporciona nutrientes frescos para el embrión y elimina desechos tóxicos. Vilariño y col. (2012) reportaron una mejora en el porcentaje de blastocistos al día 6 de 33.6% (78/232) a 42.0% (102/243) realizando el cambio de medio el día 3 luego de la FIV ($P < 0.05$), además estos resultados demuestran que estas condiciones de cultivo generan buenos resultados en la PIVE.

Otra opción al sistema semi-definido, es la combinación de diferentes medios de cultivo. A partir de ovocitos de recolectados por LOPU, Cox y Alfaro (2007) obtuvieron un 61,5% de blastocistos, cultivando los embriones en medio SOF suplementado con BSA durante 5 días y luego 2 días en TCM 199 suplementado con BSA.

Comparando el sistema semi-definido con el co-cultivo en el CIV, Heidari y col. (2013) encontraron que el desarrollo embrionario fue llevado a cabo de mejor manera en el sistema de cultivo semi-definido en comparación con el co-cultivo. Aunque el aplicación del co-cultivo, especialmente con MSC, durante los primeros 3 días del cultivo, podrían mejorar la calidad de los blastocistos resultantes.

Otras moléculas han sido probadas en el CIV con la finalidad de mejorar los resultados de la PIVE en ovinos. Como por ejemplo la ghrelina, esta es una hormona con un patrón de expresión generalizado en el organismo de los mamíferos, incluyendo los órganos reproductivos y también embriones, Wang y col. (2013) encontraron que la adición de 50 ng/ml de ghrelina al medio SOF durante el CIV promovió la formación de blastocistos y aumentó los niveles de expresión de los genes *GLUT1* (transporte y metabolismo de la glucosa) e *IFN-T* (reconocimiento materno de la gestación).

3.1.4.1.3 Sistema de cultivo *in vitro* secuencial

Los avances en la mejor comprensión de los requisitos del embrión durante el desarrollo ha llevado a establecer que los componentes de los medios y las condiciones físicas deben cambiarse durante el cultivo para lograr un mejor desarrollo embrionario, resultando en el desarrollo de medios secuenciales donde los componentes cambian de acuerdo con las necesidades del embrión (Thompson y col., 2000). Estos medios imitarían el cambio en el ambiente que experimenta el embrión durante el desarrollo *in vivo*. Originalmente, en el sistema de cultivo secuencial desarrollado por Gardner y Lane (1998), las concentraciones de glucosa, lactato y piruvato en G1 y G2 (medios secuenciales), derivaron de mediciones realizadas de las concentraciones metabólicas en el fluido del tracto reproductivo en humano durante el ciclo menstrual.

García-García y col. (2007) probaron los medios secuenciales disponibles comercialmente para ovinos G1.3/G2.3 suplementados con BSA, en este experimento obtuvieron un 21.5% de blastocistos, muy similar a lo obtenido con el medio SOF suplementado con 5% de SFB (24.1%); sin embargo, el porcentaje de eclosión fue menor para los embriones cultivados en G1.3/ G2.3 en comparación a los cultivamos en medio SOF suplementado con 5% de SFB (44.3% y 86.6%, respectivamente; $P < 0.0001$).

3.1.4.2. Condiciones de cultivo

Ya sea el co-cultivo con células somáticas, el sistema definido o semi-definido, habitualmente el CIV se lleva a cabo en grupos, donde se reportan los mayores porcentajes de blastocistos y una mejor calidad embrionaria, en comparación al cultivo de una sola estructura. Se sabe que los embriones producen factores que estimulan su desarrollo recíprocamente durante el CIV (Gardner y col. 1994). La mayoría de los laboratorios utiliza gotas de medio de CIV con un volumen de 1 a 2 μ l por embrión, cubiertas por aceite mineral o de parafina, en una atmósfera humidificada con 5% de O_2 , 5% de CO_2 y 90% de N_2 a una temperatura entre 38.5 a 39°C (Paramio e Izquierdo, 2016). Un sistema de CIV individual sería muy útil cuando se trabaja con animales de alto valor genético, ya que implica la realización de LOPU y en este caso número de embriones en CIV dependerá en parte de la recuperación COCs. Otros métodos se han desarrollado con la finalidad de mantener la individualidad en el CIV de embriones, como por ejemplo la utilización de microfluidos en PIVE (Krisher y Wheeler, 2010), el sistema *well-of-the-well* (Vajta y col., 2008) o el uso de sustancias adhesivas (Matoba y col., 2010).

Como se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo es un importante factor a considerar en la PIVE, el daño por estrés oxidativo afecta tanto al cultivo de gametos como de embriones, incidiendo en el rendimiento global de embriones viables. Para evitar esos inconvenientes cuando se utilizan atmósferas con 20% de O_2 en el CIV, una estrategia utilizada para controlar los niveles de ROS, es la suplementación del medio de cultivo con antioxidantes. El α -tocoferol es un compuesto liposoluble, este

es compuesto el más activo del grupo de tocoferoles de la vitamina E y tiene un efecto antioxidante que es bien conocido. Natarajan y col. (2010b) probaron el efecto de la suplementación con α -tocoferol durante el CIV, este compuesto agregado al medio SOF logró mejorar el desarrollo embrionario (18% vs 8% de blastocistos, con y sin α -tocoferol, respectivamente, $P<0.05$). Del mismo modo, el ácido L-ascórbico agregado al medio SOF mejoró el desarrollo embrionario (14% vs 9% de blastocistos, con y sin ácido L-ascórbico, respectivamente, $P<0.05$) (Natarajan y col. 2010a).

En conclusión, para el CIV se utilizan diversos medios de cultivo de embriones, suplementados con diferentes sustancias, con la finalidad de lograr las mejores condiciones para el desarrollo embrionario. En general los resultados obtenidos en la PIVE son variables. Entre un 50 a 80% de los ovocitos puestos en maduración, se fertilizan y pasan a dividirse a las 24 a 48 h de la FIV; y entre un 20 a 50% llega a la etapa de blastocisto, entre los días 6 y 7 luego de la FIV.

3.2. CONCLUSIONES

En el mundo, la PIVE en ovinos es una actividad comercial que es menor en comparación a otras especies como bovinos. Así mismo, es una importante herramienta de apoyo en ingeniería genética y para la investigación en general. Sin embargo, esta tecnología aún tiene algunas limitantes que resolver que son necesarias para mejorar los resultados obtenidos y simplificar la técnica.

La producción de los embriones obtenidos por PIVE es muy variable, ya que son muchos los factores que afectan los resultados. Así mismo, la PIVE en ovinos es una tecnología que todavía está en etapa de desarrollo. Las investigaciones en los últimos años han logrado grandes avances en la PIVE y los procedimientos para los pasos de MIV, FIV y CIV están bien estandarizados, pero aún requieren de algunos ajustes, ya que la mayoría de los embriones mueren durante el proceso antes de eclosionar. En general se obtienen el siguiente rango de resultados: aproximadamente entre un 70 a 90% de los ovocitos inmaduros logran madurar, del 50 al 80% se fertilizan y logran dividirse entre las 24 a 48 h después de la fertilización y solamente entre el 20 a 50% de los ovocitos logran alcanzar la etapa de blastocisto, entre los días 6 y 7.

Una de las razones atribuidas a la variabilidad en los resultados es la gran heterogeneidad de los ovocitos recuperados. La calidad o competencia de los ovocitos, es el factor clave en el éxito de programas de PIVE. Diferentes criterios son utilizados para seleccionar los mejores ovocitos, como el tamaño del folículo, el diámetro del ovocito, la apariencia morfológica y la tinción con azul de cresil brillante. Además existen nuevas líneas de investigación destinadas a mejorar la competencia de los ovocitos, como detener la maduración nuclear *in vitro* para permitir una óptima capacitación del citoplasma, el crecimiento de ovocitos dentro del folículo, la identificación de biomarcadores de competencia en ovocitos, tales como transcriptoma o análisis proteómicos en células *cumulus*, y metabolitos en el líquido folicular (Paramio e Izquierdo, 2016).

En conclusión, aún quedan desafíos por delante para mejorar la PIVE en ovinos, igualmente los avances en últimos años permiten que hoy esta tecnología esté disponible y pueda ser aplicada.

3. PROCEDIMIENTOS DE LA PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES OVINOS

La PIVE en ovinos rutinariamente se realiza mediante la ejecución de cuatro pasos sucesivos como en el siguiente esquema:

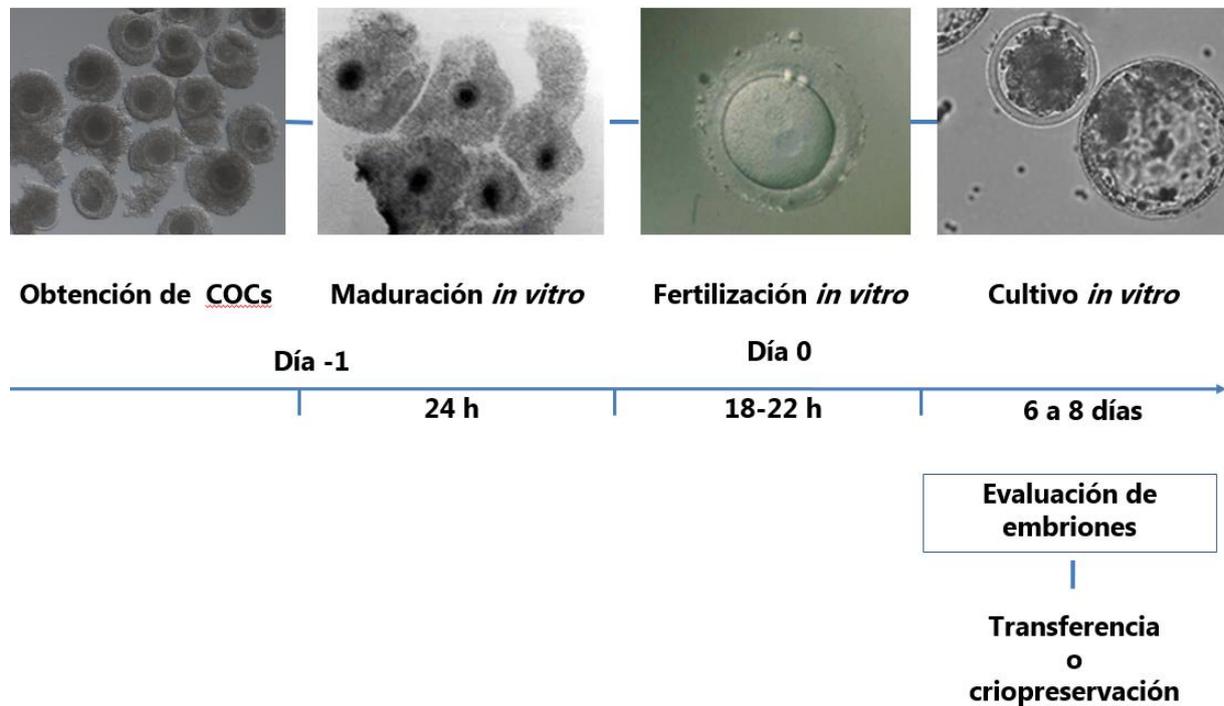


Figura 4 Esquema de pasos de la PIVE.

La PIVE comienza con la colecta de COCs obtenidos a partir de folículos antrales, posteriormente se lleva a cabo la MIV de COCs primarios que tiene una duración de 24 h. La FIV de los COCs secundarios tiene una duración de 18 a 22 h y posteriormente los presuntivos cigotos pasan al CIV por un período de 6 a 7 días hasta el estadio de blastocisto, pudiendo ser transferidos en fresco a hembras receptoras o criopreservarse. El CIV puede prolongarse hasta el día 8, donde ocurre la eclosión de los blastocistos.

Este capítulo tiene como objetivo la descripción de los procedimientos de los sucesivos pasos de la PIVE en ovinos.

4.1. COLECTA DE COMPLEJOS OVOCITOS-CELULAS DEL CUMULUS

Rutinariamente, la colecta de COCs se realiza mediante la técnica de LOPU o utilizando ovarios de matadero.

4.1.1. TECNICA DE ASPIRACION FOLICULAR POR LAPAROSCOPIA

4.1.1.1. Protocolo sincronización y superovulación

Para sincronizar e inducir la emergencia de la primera onda folicular se utiliza el protocolo de Día 0, utilizando tratamiento de progestágeno más PGF2 α y eCG. Para asegurar la ovulación a las 36 h del tratamiento con progestágeno se administra GnRH. El Día 0 es definido a las 84 h del tratamiento de presincronización (inmediatamente de la ovulación), en este momento las donantes reciben un *priming* de progesterona y un tratamiento de FSH. La progesterona es administrada utilizando un dispositivo intravaginal (DICO) desde el Día 0 al Día 3. Mientras que el tratamiento de superovulación se realiza el Día 0 con una dosis única de FSH reconstruida en ácido hialurónico. En el Día 3 se realiza la evaluación de la población folicular y aspiración folicular guiada por laparoscopia (LOPU) (figura 5).

Materiales específicos:

1. 125 μ g de análogo de prostaglandina por donante (Ciclase DL Syntex, Buenos Aires, Argentina)
2. 300 UI de eCG por donante (Norvormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina)
3. 8 μ g de análogo de GnRH por donante (Acetato de Buserelina, Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina)
4. 80 mg de FSH por donante (Folltropin-V, Vetoquinol S.A., Lurecedex, Francia) reconstruida en 10 ml de ácido hialurónico (MAP-5, Vetoquinol S.A., Lurecedex, Francia)
5. Dispositivos intravaginales liberadores de progesterona (DICO, 0,3 g de progesterona, Syntex, Buenos Aires, Argentina)
6. Esponjas intravaginales de poliuretano impregnadas con análogo de Progesterona, 60 mg MAP/esponja (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina)

Procedimientos:

El protocolo de sincronización y superovulación se realiza de acuerdo al siguiente esquema.

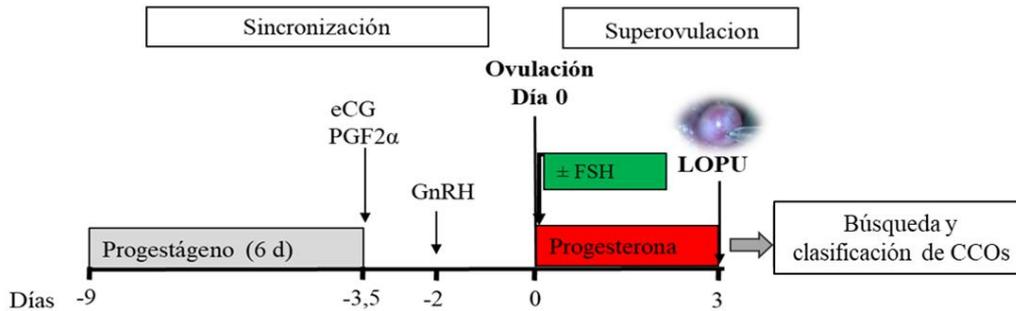


Figura 5 Protocolo de sincronización y superovulación. El tratamiento de sincronización de la ovulación se realiza utilizando el protocolo Día 0 (Menchaca y col., 2010) mientras que el tratamiento de superovulación se realiza el día 0 con una dosis única de FSH reconstruida en ácido hialurónico, la progesterona se administra utilizando dispositivo intravaginal (DICO) desde el día 0 al día 3. El día 3 se realiza la LOPU. Fuente: adaptado de Cuadro F (2018).

4.1.1.2. Preparación de donantes

Para realizar el procedimiento de LOPU, deben tenerse en cuenta consideraciones previas de ayuno: 24 h de ayuno de sólidos y 12 h ayuno de líquidos. Durante el procedimiento los animales deben permanecer en plano anestésico.

Materiales específicos:

1. 100 mg de ketamina (Vetanarcol, König, Buenos Aires, Argentina)
2. 5 mg de diazepam por donante (Unizepan, Unimedical, Montevideo, Uruguay)
3. Equipo de anestesia inhalatoria
4. Isoflurano (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brasil)

Procedimientos:

1. La donante es colocada sobre una mesa estándar de laparoscopia.
2. Debe realizarse la inducción a la anestesia general utilizando una combinación de diazepam y ketamina.
3. Durante el procedimiento de LOPU los animales deben permanecer bajo anestesia inhalatoria con isoflurano.

4.1.1.3. Aspiración folicular

Materiales específicos:

1. Equipo de laparoscopia:
 - 1.1 Telescopio de ángulo 0° de 5 mm de diámetro
 - 1.2 Dos sets de cánula y trocánter de 5,5 mm (uno para el laparoscopia y otro para el fórceps)
 - 1.3 Un set de trocánter y cánula de 3,4-5 mm para la aspiración. Consiste en un tubo colector, con el interior conectado a una pipeta de aspiración

y exteriormente conectado por un tubo a una bomba de vacío. La pipeta de aspiración consta de una aguja de bisel corto 20 G conectada a la punta de un tubo de acrílico de 30 cm, con un diámetro externo de 3 mm y 1 mm de diámetro interno.

- 1.4 Un fórceps atraumático de 5 mm
- 1.5 Un cable de fibra óptica
- 1.6 Una fuente de luz
2. Lupa estereoscópica (SZ 61, Olympus, FL, USA)
3. Medio de Búsqueda
4. Oxitetraciclina (Terramicina, LA, Zoetis, Buenos Aires, Argentina)
5. Placas de Petri 90 mm y tapa de placa cuadrículada para búsqueda
6. Solución fisiológica de NaCl⁽²⁸⁾
7. Tubos Falcon 50 ml

Procedimientos:

1. Realizar una técnica aséptica durante el procedimiento de LOPU.
2. Una vez en la cavidad abdominal, exponer la superficie ovárica manipulando la fimbria con el fórceps en diferentes direcciones para realizar la punción y aspiración de los folículos.
3. Con la pipeta de aspiración, puncionar los folículos medianos y grandes; los folículos se clasifican en pequeños (menores a 3 mm), medianos (de 3-5 mm) y grandes (mayores a 5 mm).
4. El líquido folicular se recupera en tubos Falcon de 50 ml.
5. Para realizar la búsqueda de los COCs, el líquido recuperado es colocado en placas de Petri de 90 mm.
6. Realizar la búsqueda y clasificación de COCs bajo lupa estereoscópica (SZ 61, Olympus, FL, USA) con un aumento de 20x y 40x, respectivamente, colocando una tapa de placa cuadrículada para búsqueda.
7. La clasificación se realiza teniendo en cuenta el número de capas de células del *cumulus* y homogeneidad en el citoplasma. Clasificar los COCs utilizando el siguiente esquema de graduación:
 - **Grado 1:** bueno, completamente rodeado por múltiples y compactas células del *cumulus*, citoplasma homogéneo.
 - **Grado 2:** regular, parcialmente rodeado por células del *cumulus*, citoplasma poco homogéneo con zonas periféricas oscuras.
 - **Grado 3:** desnudo, citoplasma irregular y oscuro.
 - **Grado 4:** ovocitos rodeados por fibrina, células expandidas envejecidas, citoplasma irregular con zonas oscuras.

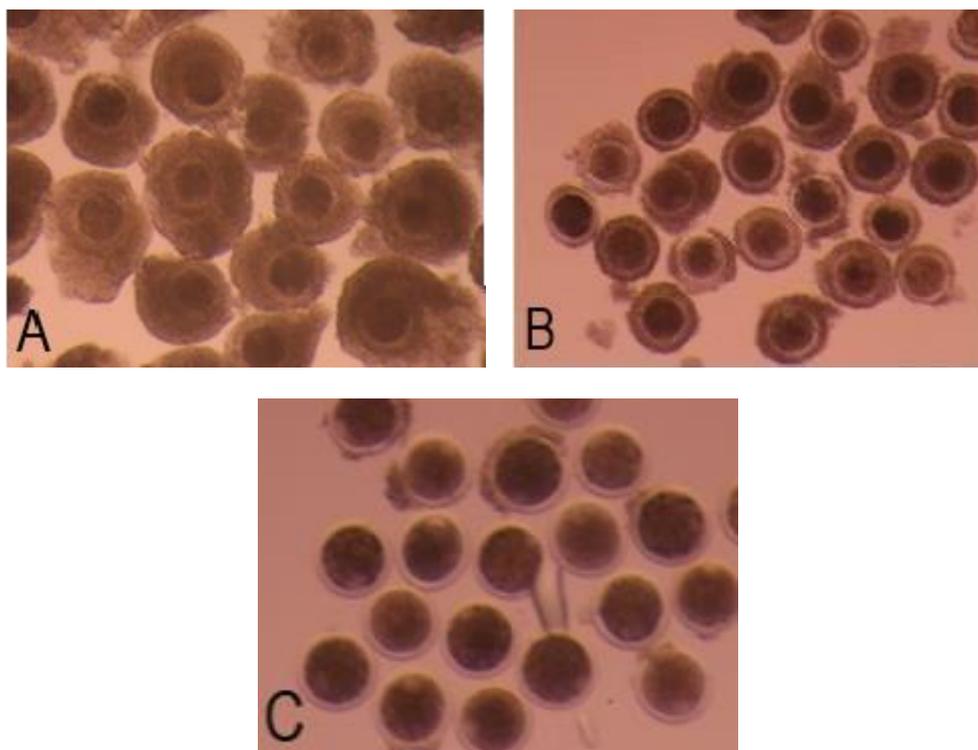


Figura 6 COCs obtenidos por la técnica de LOPU. Figura 6. Complejos ovocitos-células del *cumulus* obtenidos por la técnica de aspiración folicular por laparoscopia. A. Ovocitos grado 1. B. Ovocitos grado 2. C Ovocitos grado 3. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (40x).

8. Luego de la aspiración folicular, se procede al lavado del ovario con 40-60 ml de solución fisiológica de NaCl⁽²⁷⁾ suplementada con antibiótico para minimizar adherencias.
9. Al finalizar cada sesión de LOPU realizar un tratamiento con 0,5 mg/kg de Oxitetraciclina (Terramicina, LA, Zoetis, Buenos Aires, Argentina).



Figura 7 Fotografías de LOPU.

4.1.2. COLECTA DE OVARIOS DE MATADERO

4.1.2.1. Colecta ovarios

Materiales y equipo:

1. Guantes látex sin polvo
2. Penicilina G alícuota para frigorífico (1%), almacenada en -20°C
3. Recipiente térmico para transporte de ovarios
4. Solución fisiológica de NaCl⁽²⁸⁾ al 0,9%
5. Termómetro
6. Tijeras disección

Procedimientos:

Los ovarios son obtenidos de hembras de frigorífico, mediante la extracción por corte del aparato reproductor. Para ello se procede al ingreso a la planta de faena donde se realiza el procedimiento de extracción.

1. Extraer los ovarios mediante un corte sobre el aparato reproductor de la hembra con tijera de disección a nivel del oviducto.
2. Depositar los ovarios en el recipiente térmico a medida que se obtienen.
3. Llevar la solución fisiológica a una temperatura entre 30-35°C y adicionar penicilina G (1%).
4. Realizar entre 2 a 3 lavados sobre los ovarios con la solución fisiológica entibiada y suplementada con antibiótico.
5. Transportar los ovarios en la misma solución, límpida y a temperatura entre 30-35°C.
6. El arribo al laboratorio para el posterior procesamiento deberá realizarse dentro de las 2 h de extraídos.

4.1.2.2. Punción de ovarios y recuperación de complejos ovocitos-células del *cumulus*

Materiales y equipo:

1. Agujas verdes 21 G
2. Baño María a 30-35°C
3. Colador
4. Gradilla
5. Guantes de látex sin polvo e indumentaria apropiada
6. Jeringas 5 ml con émbolo plástico para punción
7. Medio de Recuperación
8. Papel toalla
9. Recipiente para ovarios, recipientes de descarte para: ovarios y material biológico contaminado
10. Solución fisiológica de NaCl⁽²⁸⁾ al 0,9, templada a 30-35°C

11. Tubos Falcon 15 ml (depósito de líquido folicular)

Procedimientos:

1. Colocar los elementos necesarios en la superficie de trabajo.
2. Preparar el baño María a una temperatura entre 30-35°C con el recipiente para ovarios, tubos Falcon 15 ml para el depósito de líquido recuperado y el medio de Recuperación.
3. Colocar los ovarios en un colador y lavar con solución fisiológica a temperatura entre 30-35°C (figura 8).



Figura 8 Fotografía de ovarios ovinos.

4. Luego colocar los ovarios en el correspondiente recipiente en el baño María.
5. Para comenzar la punción, cargar jeringa con 0.2-0.3 ml de medio de Recuperación.
6. Tomar un ovario y secarlo con papel toalla.
7. Puncionar folículos entre 2 y 5 mm de diámetro, posicionando el bisel de la aguja hacia abajo (figura 9).

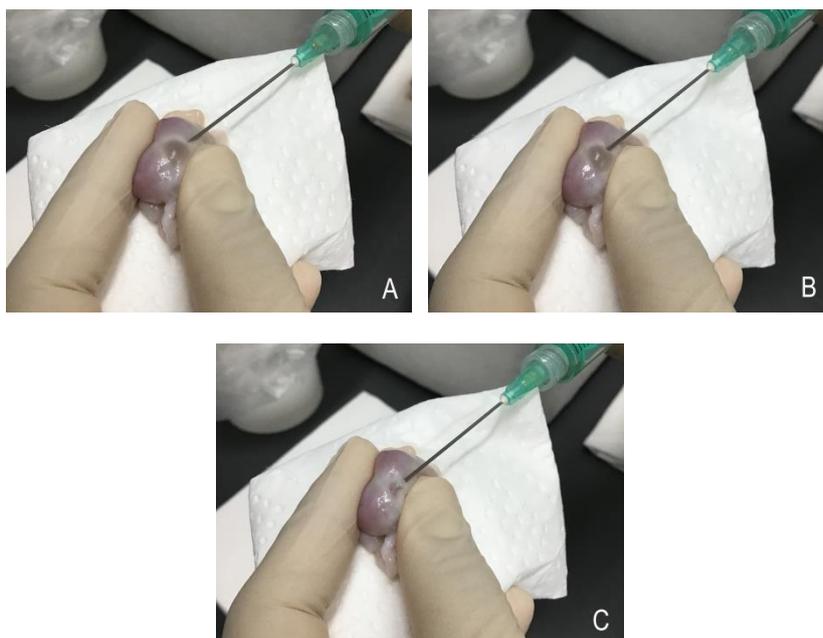


Figura 9 Fotografías de punción y aspiración de ovario. A, B y C: secuencia de punción y aspiración de ovario.

8. Continuar puncionando ovarios hasta completar 2 ml de líquido recuperado.
9. Una vez completados 2 ml de la jeringa, vaciar en un tubo Falcon de 15 ml y mantener el líquido recuperado en el baño María. El líquido folicular conteniendo los ovocitos debe ser depositado retirando la aguja, suavemente y contra la pared del tubo Falcon.
10. Luego de vaciar la jeringa volver a cargar con 0.2-0.3 ml de medio de Recuperación para continuar puncionando.
11. Repetir el procedimiento hasta finalizar la punción.

4.1.3. MANIPULACION DE OVOCITOS Y EMBRIONES

4.1.3.1. Elaboración de capilares para manipulación de ovocitos y embriones

Materiales y equipo:

12. Capilares microhematocrito de vidrio sin heparina⁽⁵⁾
13. Mechero Bunsen
14. Pinza y cortador para capilares
15. Tubuladura para manipulación embrionaria

Procedimientos:

1. Precalear el capilar de vidrio rápidamente (figura 10).



Figura 10 Fotografía de precalentado de capilar.

2. Calentar en la zona alta de la llama del mechero, la parte del capilar donde posteriormente se realizará el corte, cuando el capilar esté lo suficientemente blando, retirar de la llama y rápidamente estirarlo con una pinza de un extremo (figura 11).

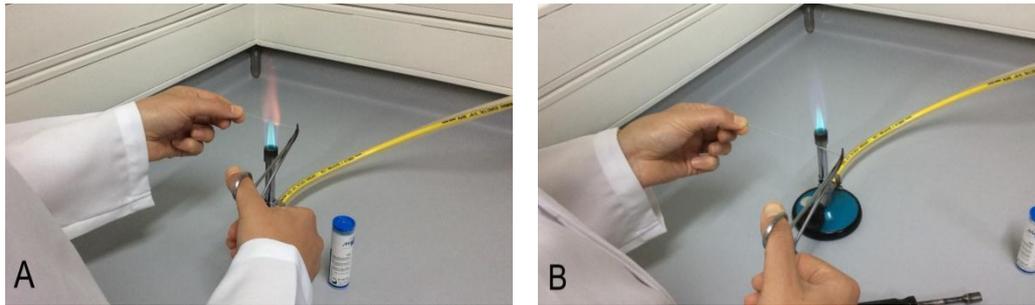


Figura 11 Fotografías de secuencia de elaboración de capilar para manipulación. A: calentando capilar de vidrio en zona en la llama del mechero. B: estirando el capilar con pinza.

3. Dividir el capilar utilizando un cortador de capilares, de forma tal que se obtenga un buen tamaño de la sección afinada (figura 12).



Figura 12 Fotografía realizando corte de capilar.

4. Evaluar el extremo afinado donde se realizó el corte, éste puede presentar un borde irregular.
5. Pulir a fuego, girando el capilar en la parte caliente de la llama del mechero hasta suavizar el borde. Ser cuidadoso para que el diámetro interior no disminuya con el redondeo del borde.

Nota:

La longitud de la sección afinada del capilar como el diámetro de ésta dependerá de la temperatura de exposición y de la forma con la que se estira el capilar, ajustando a las necesidades requeridas.

4.1.3.2. Manipulación de ovocitos/embriones

La manipulación de ovocitos como de embriones se realiza utilizando un capilar colocado en una tubuladura (figura 13).

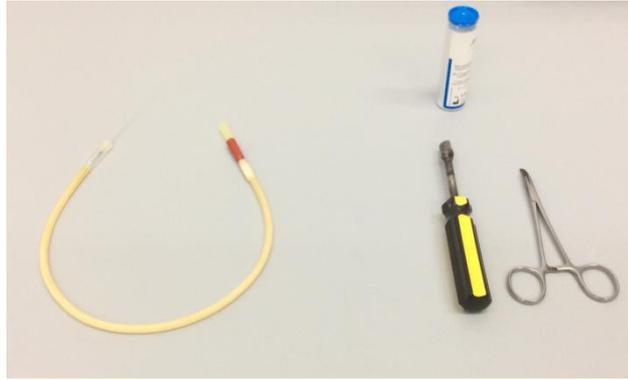


Figura 13 Fotografía de capilar colocado en tubuladura listo para ser utilizado para la manipulación de ovocitos/embriones. Tubo de capilares de microhematocrito de vidrio sin heparina, pinza y cortador para capilares.

Procedimientos:

1. Colocar la boquilla de la tubuladura de manipulación en la boca.
2. Bajo la lupa estereoscópica, visualizar una gota de medio para introducir la punta del capilar, por capilaridad el medio llenará la punta del capilar.
3. Utilizando la boquilla, aspirar para succionar ovocitos/embriones dentro del capilar, espirar para depositar en una gota de medio.
4. Podrán realizarse burbujas de aire para enlentecer la subida y bajada, introduciendo medio/aire/medio (figura 14).

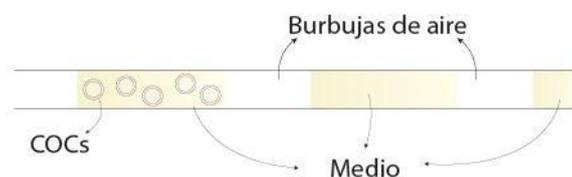


Figura 14 Capilar con burbujas de aire entre el medio de manipulación. En el ejemplo se están manipulando COCs.

4.1.4. BUSQUEDA Y CLASIFICACION DE COMPLEJOS OVOCITOS-CELULAS DEL CUMULUS

Materiales y equipo:

1. Capilares microhematocrito de vidrio sin heparina⁽⁵⁾
2. Estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂) (MCO-5AC-PE, Panasonic)
3. Lupa estereoscópica (SZ, Olympus, FL, USA)
4. Medio de Búsqueda
5. Micropipetas de volumen variable y punteros
6. Placas de Petri 90 mm, 60 mm y 35 mm
7. Platina a 37°C

8. Tapa de placa cuadrículada para búsqueda

4.1.4.1. Búsqueda y clasificación de complejos ovocitos-células del *cumulus*

Procedimientos:

1. Preparar platina caliente a 37°C con los elementos a utilizar: tubos Falcon con líquido folicular conteniendo COCs, placas de Petri 90 mm, tapa de placa cuadrículada para búsqueda, placa de Petri 35 mm para depósito de COCs recuperados, medio de Búsqueda (figura 15).

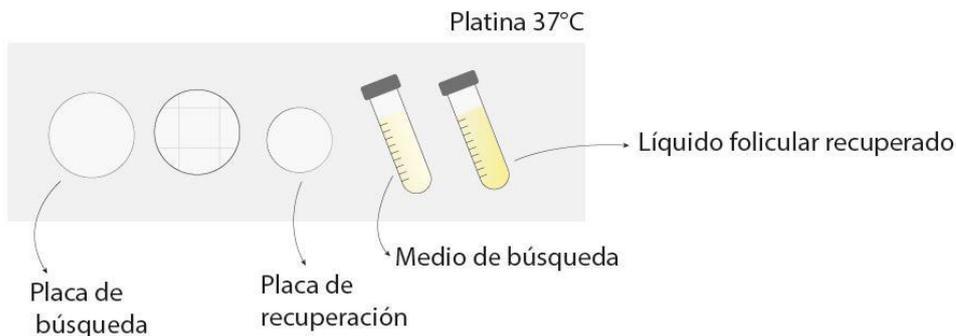


Figura 15 Esquema de organización del material para la búsqueda de COCs en el laboratorio. Platina encendida a 37°C, placa de Búsqueda, tapa de placa cuadrículada, placa de recuperación, tubo Falcon con medio de Búsqueda y tubo Falcon con líquido folicular.

2. Preparar capilares y tubuladura para manipulación de COCs.
3. Colocar el líquido folicular conteniendo COCs sobre una placa de Petri de 90 mm y agregar un volumen de medio de Búsqueda precalentado en incubadora, de forma tal que cubra la superficie de la placa.
4. A continuación se procede a la búsqueda y recuperación de COCs bajo la lupa estereoscópica a un aumento de 20x a 40x, colocando por debajo de la placa de Petri una tapa de placa cuadrículada, realizar la búsqueda en guarda griega siguiendo un orden en los cuadrantes (figura 16).



Figura 16 Esquema para realizar la búsqueda de COCs bajo la lupa. Placa de búsqueda 90 mm sobre tapa cuadrículada. Guarda griega indicando el sentido de la búsqueda de COCs.

5. Colocar los COCs recuperados en una placa de Petri de 35 mm conteniendo medio de Búsqueda de manera tal que facilite la visualización para la posterior clasificación.
6. Evaluar y clasificar los COCs con un aumento de 40x teniendo en cuenta características morfológicas de las células del *cumulus* y homogeneidad del citoplasma utilizando el siguiente esquema de graduación:
 - **Grado 1:** bueno, completamente rodeado por múltiples y compactas células del *cumulus*, citoplasma homogéneo.
 - **Grado 2:** regular, parcialmente rodeado por células del *cumulus*, citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.
 - **Grado 3:** desnudo, citoplasma irregular.
 - **Grado 4:** ovocitos rodeados por fibrina, células expandidas envejecidas, citoplasma irregular con zonas oscuras.

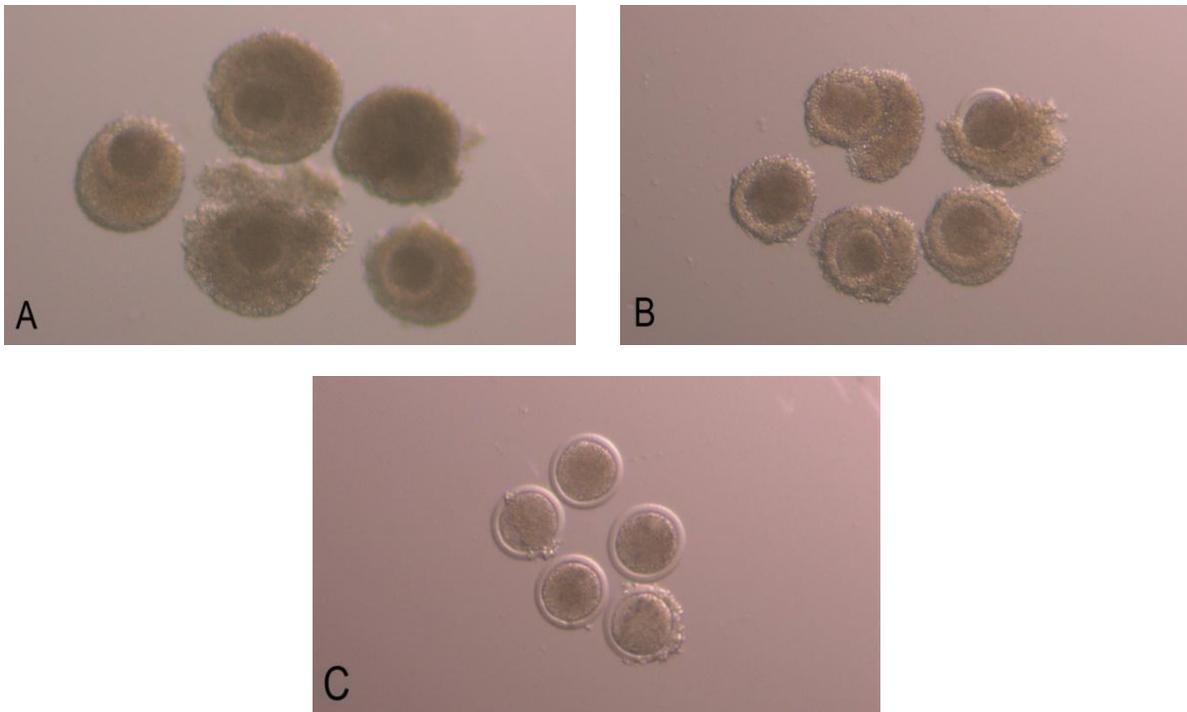


Figura 17 COCs obtenidos por punción y aspiración folicular de ovarios ovinos de hembras de matadero. A. Ovocitos grado 1. B. Ovocitos grado 2. C Ovocitos grado 3. Fotografías tomadas con lupa estereoscópica (50x).

7. Seleccionar los ovocitos de calidad A y B que posteriormente pasarán a maduración *in vitro* (figura 18).

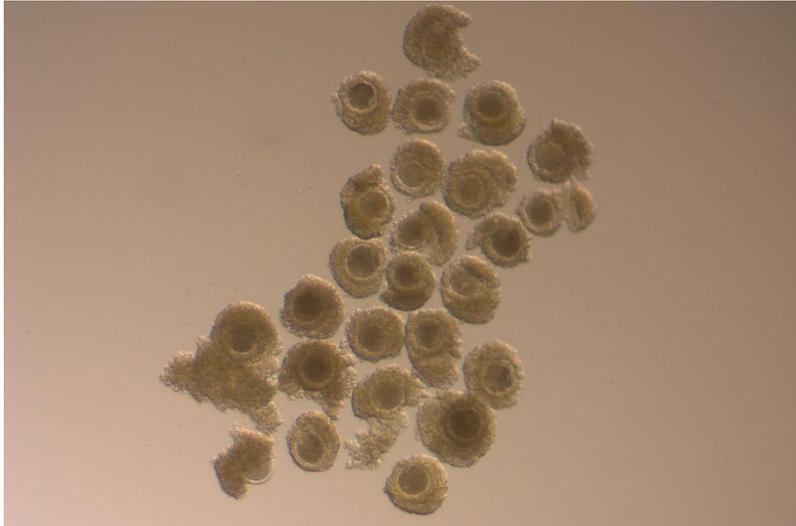


Figura 18 COCs de calidad A y B seleccionados para la MIV. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (40x).

4.1.4.2. Lavado de complejos ovocitos-células del *cumulus* en medio de Búsqueda

Procedimientos:

1. En una placa de Petri de 90 mm, realizar una gota de 200 μ l de medio de Búsqueda y colocar los COCs seleccionados.
2. Posteriormente realizar lavados en medio de Búsqueda, para ello realizar tres gotas de 30 μ l de medio de Búsqueda por cada 25-30 COCs, de esta forma se realizan pasajes hasta completar tres lavados (figura 19).

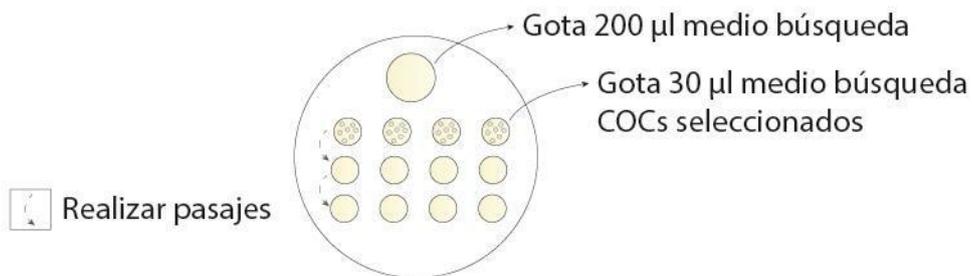


Figura 19 Placa de lavado en medio de Búsqueda. Gota de 200 μ l y gotas de lavado de 30 μ l conteniendo COCs seleccionados en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.

4.2. MADURACION *IN VITRO*

Materiales y equipo:

1. Capilares microhematocrito de vidrio sin heparina⁽⁵⁾
2. Estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂) (MCO-5AC-PE, Panasonic)
3. Gradilla
4. Lupa estereoscópica (SZ, Olympus, FL, USA)
5. Mechero Bunsen
6. Medio de Maduración equilibrando y precalentado en incubadora
7. Micropipetas volumen variable y punteros
8. Pinza y cortador para capilares
9. Placas de MIV equilibrando en incubadora
10. Placas de Petri 90 mm
11. Platina caliente a 37°C
12. Tubuladura para manipulación embrionaria

4.2.1. Lavado de complejos ovocitos-células del *cumulus* en medio de Maduración y transferencia a placa de maduración *in vitro*

Procedimientos:

1. Preparar en platina caliente a 37°C una placa de Petri de 90 mm para el lavado en medio de Maduración.
2. Para lavar la cantidad de COCs correspondientes a la placa de MIV n^o1, realizar tres gotas de 30 µl de medio de Maduración por cada 25-30 COC.
3. Bajo la lupa estereoscópica se realizan pasajes hasta completar tres lavados (figura 20).

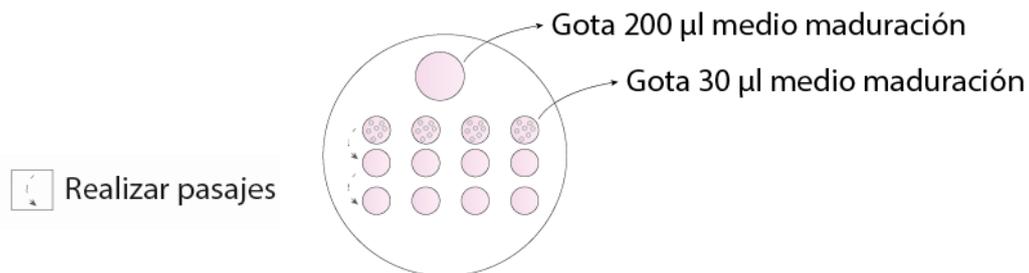


Figura 20 Placa de lavado en medio de Maduración. Gota de 200 µl y gotas de lavado de 30 µl conteniendo COCs seleccionados en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.

4. Transferir entre 25-30 COCs por gota hasta completar la placa de MIV n^o1 y depositar la placa en la estufa de incubación (figura 21).

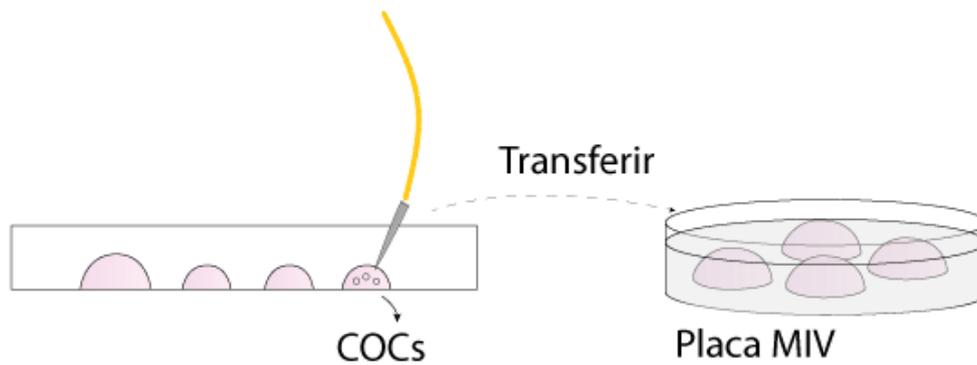


Figura 21 Transferencia de COCs seleccionados de la placa de lavado en medio de maduración a la placa de MIV. Figura 21.

5. Repetir el paso 2, 3 y 4 para lavar y transferir los COCs correspondientes a las sucesivas placas de MIV hasta finalizar la transferencia.

Nota:

Este procedimiento debe realizarse en forma rápida, el medio de maduración no posee HEPES y su pH es equilibrado con el CO₂ de la incubadora. Retirar el medio de Maduración y las placas de MIV de la incubadora únicamente para ser utilizados.

Condiciones:

- Placas de MIV: placas de Petri de 35 mm, 20-30 COCs por gota de 100 µl de medio de Maduración cubiertas por aceite mineral.
- Incubar por 24 h en estufa de incubación humidificada: 39°C y 5% de CO₂.

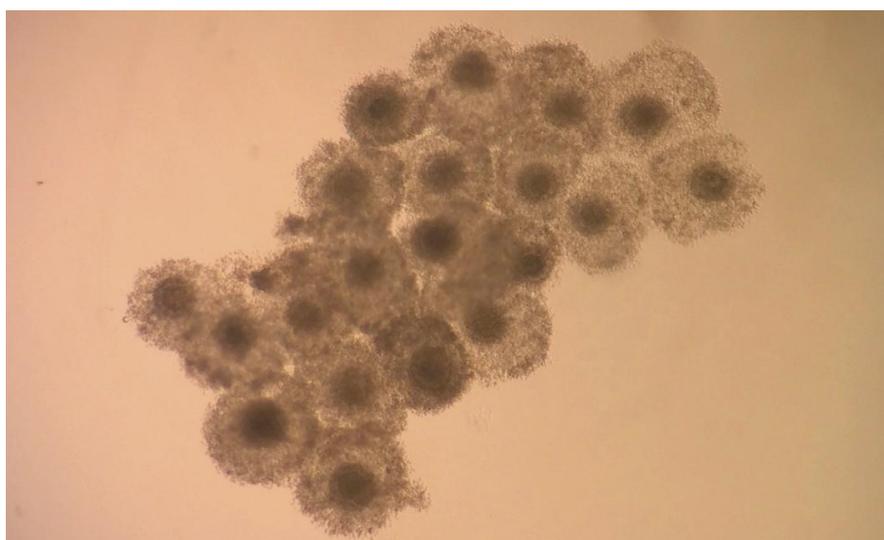


Figura 22 Fotografía de COCs maduros. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (50x).

4.3. FERTILIZACION *IN VITRO*

Materiales y equipo:

1. Agua destilada
2. Baño María a 37°C
3. Cámara Neubauer
9. Estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂) (MCO-5AC-PE, Panasonic)
4. Gafas para manipulación de nitrógeno, crio-guantes y pinza
5. Gradilla
6. Lupa estereoscópica (SZ, Olympus, FL, USA)
7. Mechero Bunsen
8. Medio SOF Fertilización
9. Micropipetas volumen variable y punteros
10. Microscopio (Eclipse E100, Nikon, Tokio, Japón).
11. Papel toalla
12. Placas de FIV pre-incubadas y equilibrando en incubadora
13. Placas de Petri de 90 mm
14. Platina caliente a 37°C
15. Porta y cubreobjetos
16. Tanque de nitrógeno líquido
17. Timer
18. Tubos Eppendorf 2 ml
19. Tubos Falcon 15 ml

4.3.1 Lavado de complejos ovocitos-células del *cumulus* en medio de Fertilización y transferencia a la placa de fertilización *in vitro*

Procedimientos:

1. Preparar en platina caliente a 37°C una placa de Petri de 90mm para el lavado en medio SOF Fertilización.
2. Para lavar la cantidad de COCs correspondientes a la placa de FIV n^o1, realizar tres gotas de 30 µl de medio SOF Fertilización por cada 20-30 COC.
3. Bajo la lupa estereoscópica, con un micropipeta retirar los COCs de la gota 1 de la placa de MIV n^o1 y depositarlos en la correspondiente gota de lavado en medio SOF Fertilización. Luego continuar la transferencia hasta transferir todas las gotas de la placa de MIV n^o1 a la placa de lavado en medio SOF Fertilización (figura 23).

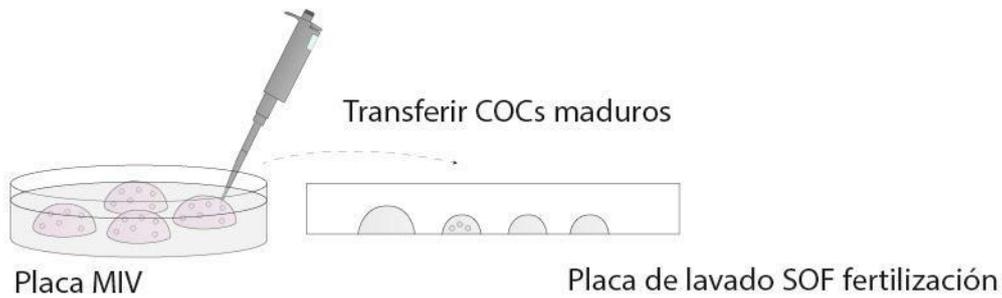


Figura 23 Transferencia de COCs maduros de la placa de MIV a la placa de lavado en medio de Fertilización.

- Realizar pasajes hasta completar tres lavados (figura 24).

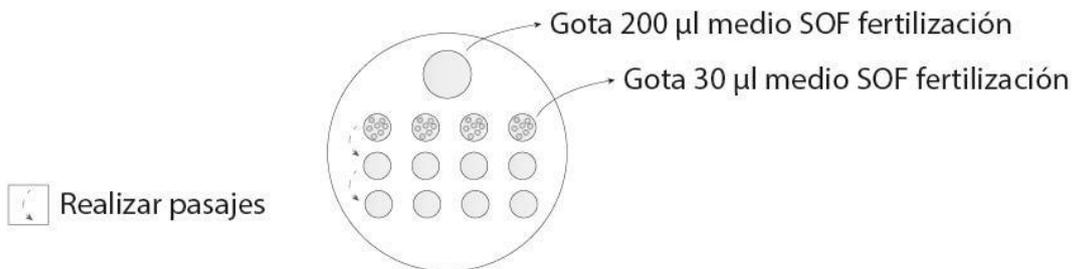


Figura 24 Placa de lavado en medio de Fertilización. Gota de 200 µl y gotas de lavado de 30 µl conteniendo COCs maduros en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.

- Transferir 20-30 COCs por gota hasta completar la placa de FIV nº1 y depositar la placa en la estufa de incubación (figura 25).



Figura 25 Transferencia de COCs maduros de la placa de lavado en medio de Fertilización a la placa de FIV.

6. Repetir el paso 2, 3, 4 y 5 para lavar y transferir los COCs correspondientes a las sucesivas placas de FIV hasta finalizar la transferencia.

Nota:

Retirar el medio SOF Fertilización y las placas de FIV de la incubadora únicamente para ser utilizados.

La transferencia de COCs debe ser cuidadosa para mantener las células del cumulus intactas.

4.3.2. Preparación del semen e inseminación

4.3.2.1. Congelación de semen

Procedimientos:

El procesamiento del semen se basa en el Protocolo en un solo paso: diluyente comercial Triadyl (Minitube-Alemania), agregado yema de huevo (20%), la dosis usada es de 70 a 100 millones de espermatozoides en pajuelas de 0,25 ml.

1. Colecta de semen mediante vagina artificial y/o electroeyaculador.
2. Evaluación de motilidad de masa e individual, morfología mediante un microscopio de contraste de fase y concentración mediante espectrofotómetro.
3. Inmediatamente se le agrega el diluyente comercial Triadyl (Minitube-Alemania) precalentado a 35°C, en una dilución 1:1 y se deja a baño María durante 10 minutos.
4. Pasados los 10 minutos se completa la dilución final y se coloca a baño María en una vitrina refrigerada donde se realiza el descenso de temperatura a razón de 0,3°C/min, es decir que 1,5 h llega a temperatura de 4°C.
5. Equilibración, permanece de 1 a 3 h más, a temperatura de 4°C.
6. Se realiza el llenado de las pajuelas usando una llenadora automática MPP1 (Minitube-Alemania) que sella las pajuelas mediante ultrasonido.
7. Las pajuelas son impresas con el nombre, número de registro, raza del carnero y la fecha de colecta para su identificación.
8. La congelación se realiza sobre vapores de nitrógeno durante 10 minutos y luego va directamente al nitrógeno líquido.
9. 24 a 48 h post congelación se realiza la evaluación de 2 a 3 pajuelas, evaluando motilidad progresiva y vigor a la hora 0 y 2 h post-descongelado, concentración final de la pajuela y morfología de cada partida congelada.

Se aceptan como aptas partidas que tengan un mínimo de 40% de motilidad progresiva a la descongelación, 20 millones de espermatozoides viables en la dosis y máximo de 20% de anomalías espermáticas.

4.3.2.2. Descongelación de semen y evaluación pos descongelado

Procedimientos:

1. Preparar la platina caliente a 37°C: un tubo Eppendorf identificado “semen descongelado”, un tubo Eppendorf identificado “Swim up”, porta y cubreobjetos para evaluación previa y posterior al Swim up.
2. Preparar el baño María a 37°C para la descongelación del semen.
3. Descongelar una pajuela de semen en el baño María a 37°C durante 30 segundos; utilizar pinza, gafas de protección y crio-guantes.
4. Retirar la pajuela del baño María, secar la pajuela con papel toalla y depositar el semen en el tubo Eppendorf precalentado e identificado como semen descongelado y mantener en la platina caliente.

Esquema descongelación de semen

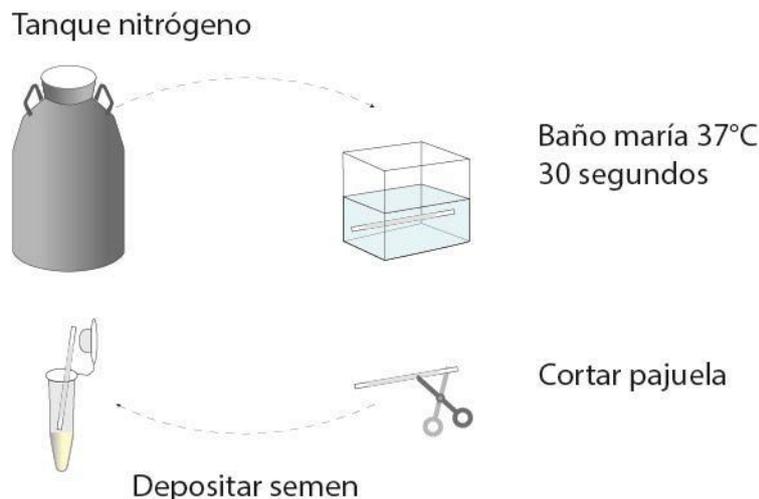


Figura 26 Esquema de descongelación de semen.

5. Sobre un portaobjetos precalentado, realizar una alícuota de 5-10 μ l de semen descongelado, colocar cubreobjetos.
6. Llevar al microscopio y evaluar viabilidad post descongelado, con la finalidad de asegurar que la pajuela ha sido descongelada correctamente y que hay espermatozoides vivos para recuperar.

4.3.2.3. Selección espermática: método de *Swim up*

Procedimientos:

1. Previamente, preparar un tubo Falcon con 1 ml de medio SOF Fertilización, identificado como “*Swim up*” y mantenerlo en la incubadora hasta su utilización.

2. Al momento de realizar la técnica, retirar el tubo Falcon “*Swim up*” y depositar lentamente el semen descongelado en el fondo del tubo (figura 27).

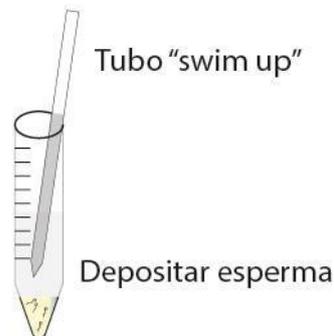


Figura 27 Depósito de esperma en tubo de *Swim up*.

3. Incubar el tubo Falcon “*Swim up*” con la tapa abierta y una inclinación de 45° durante 15 minutos (figura 28).

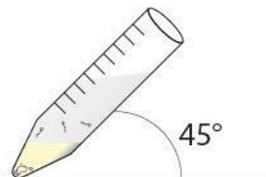


Figura 28 Tubo de *Swim up* con inclinación de 45° para incubación.

4. Al finalizar el tiempo tomar el tubo Falcon “*Swim up*”, retirar 840 µl de la fracción superior (figura 29) y depositar en el tubo Eppendorf identificado “*Swim up*”, mantener en platina caliente hasta su uso.



Figura 29 Retirado del sobrenadante con la fracción motil luego del *Swim up*.

4.3.2.4. Evaluación de esperma

Procedimientos:

1. Sobre un portaobjetos precalentado, realizar una alícuota de 5-10 µl de semen post *Swim up*, colocar cubreobjetos.
2. Llevar al microscopio.

3. Evaluar motilidad individual.

4.3.2.5. Concentración espermática, cálculo de dosis e inseminación

Procedimientos:

1. Realizar una dilución 1/100:
 - i. 900 µl agua filtrada
 - ii. 10 µl de semen post Swim up
2. Homogeneizar.
3. Cargar la cámara de Neubauer por capilaridad, esperar entre 3-5 minutos la decantación de los espermatozoides.
4. Llevar al microscopio, contar los cuatro cuadrantes externos de la cámara (n) y calcular la cantidad de espermatozoides/ml, utilizando la siguiente ecuación:

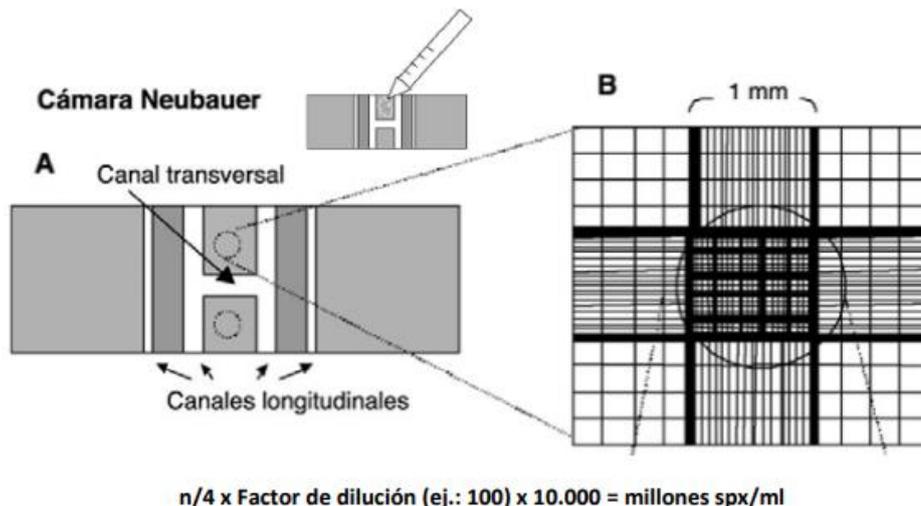


Figura 30 Esquema de cámara de Neubauer.

5. Calcular la cantidad de espermatozoides en 840 µl del sobrenadante post *Swim up*.
6. Calcular el volumen que se necesita para inseminar con 1×10^6 /gota.
7. Inseminar las correspondientes placas de FIV y depositar las placas en la estufa de incubación.

Condiciones:

- Placas de FIV: placas de Petri de 35 mm, 20-30 COCs por gota de 100 µl de medio SOF Fertilización cubiertas por aceite mineral.
- Incubar por 18 a 22 h en estufa de incubación humidificada: 39°C y 5% de CO₂.

4.4. CULTIVO *IN VITRO*

Materiales y equipo:

1. Agua destilada
2. Cámara de trigas
3. Capilares microhematocrito de vidrio sin heparina⁽⁵⁾
4. Estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂) (MCO-5AC-PE, Panasonic)
5. Gradilla
6. Lupa estereoscópica (SZ, Olympus, FL, USA)
7. Mechero Bunsen
8. Medio SOF Desarrollo
9. Micropipetas volumen variable y punteros
10. Pinza y cortador para capilares
11. Placas de CIV pre-incubadas y equilibrando en incubadora
12. Placas de Petri 90 mm y 60 mm
13. Platina caliente a 37°C
14. Trigas (90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂)⁽²⁹⁾
15. Tubo Falcon 50 ml
16. Tubuladura para manipulación embrionaria

4.4.1. Remoción de células del *cumulus*

Procedimientos:

1. Preparar en platina caliente a 37°C una placa de Petri de 90 mm para la remoción de células del cumulus y lavado en medio SOF Desarrollo.
2. Preparar capilares y tubuladura para manipulación de los presuntivos cigotos.
3. Colocar una gota de 200 µl de medio SOF Desarrollo en una placa de Petri de 90 mm para realizar la remoción de las células del cumulus (figura 30).

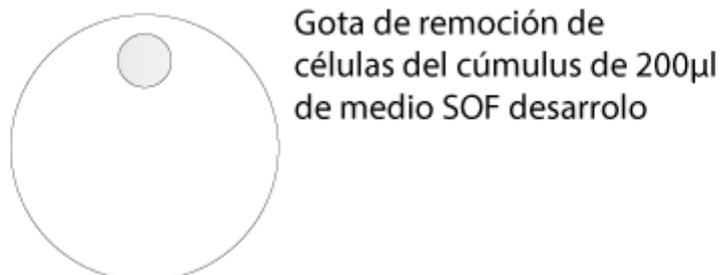


Figura 31 Gota de remoción de las células del *cumulus*.

4. Bajo la lupa estereoscópica, con un micropipeta retirar los presuntivos cigotos de la gota 1 de la placa de FIV n°1 y depositarlos en la gota de medio SOF Desarrollo. Continuar la transferencia hasta transferir todas las gotas de la placa de FIV n°1 (figura 32).

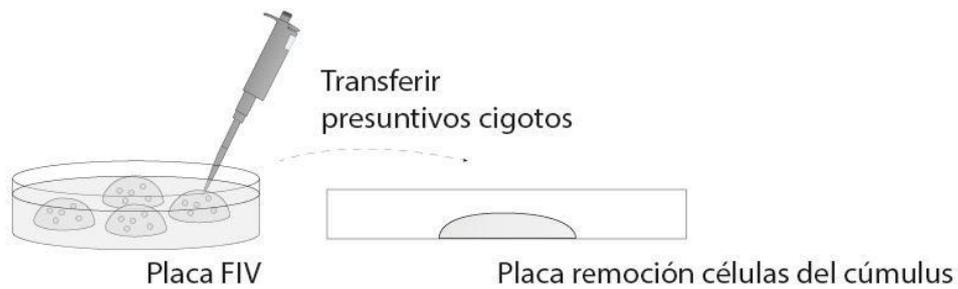


Figura 32 Transferencia de los presuntivos cigotos de la placa de FIV a la placa de remoción de células del *cumulus*.

5. Repetir el paso 3 para transferir los presuntivos cigotos de las sucesivas placas de FIV a la gota de remoción.
6. Con una micropipeta de 200 μl pipetear la gota con los presuntivos cigotos sucesivas veces hasta remover las células del *cumulus* (figura 33).

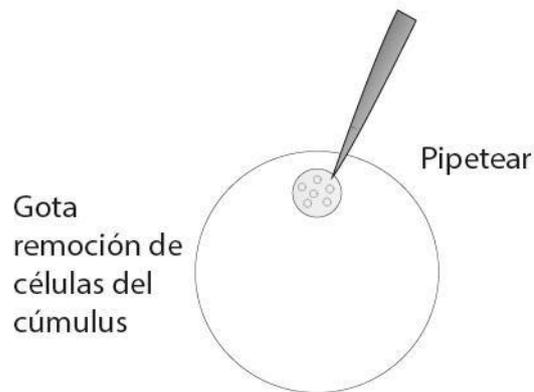


Figura 33 Remoción de células del *cumulus*.

4.4.2. Lavado de cigotos en medio de Desarrollo y transferencia a placa de cultivo *in vitro*

Procedimientos:

1. Para lavar los presuntivos cigotos, realizar tres gotas de 30 μl de medio SOF Desarrollo por cada 20-30 cigotos.
2. Utilizando un capilar, realizar pasajes hasta completar tres lavados (figura 34).

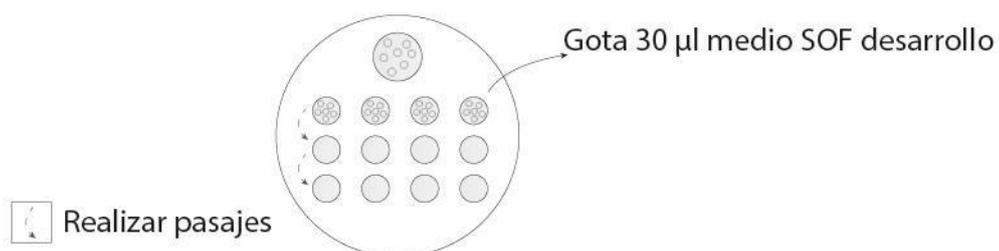


Figura 34 Placa de lavado en medio de Desarrollo. Gota de 200 μ l y gotas de lavado de 30 μ l conteniendo los presuntivos cigotos en la primera fila. Las flechas indican el sentido del lavado.

3. Transferir 20-30 cigotos por gota hasta completar la placa de CIV n°1 (figura 35) y depositar la placa en la estufa de incubación.

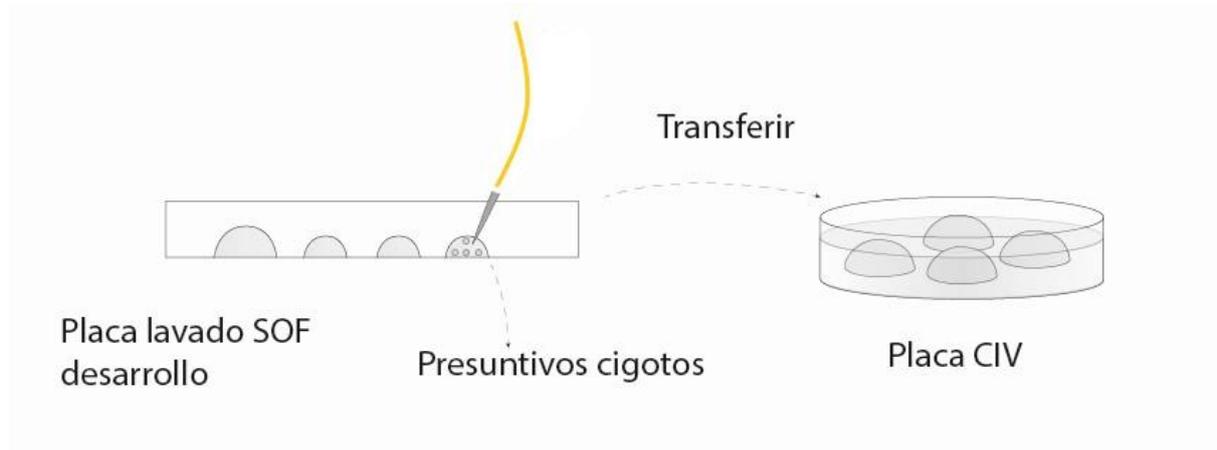


Figura 35 Transferencia de los presuntivos cigotos de la placa de lavado en medio de Desarrollo a la placa de CIV.

4. Repetir el paso 3 para realizar las transferencias a las sucesivas placas de CIV.

Nota:

Retirar el medio SOF Desarrollo y las placas de CIV de la incubadora únicamente para ser utilizados.

4.4.3. Cámara de trigas e incubación

Procedimientos:

1. La cámara de trigas debe estar previamente limpia, colocar una placa de Petri de 60 mm con agua destilada.
2. Preparar un tubo Falcon 50 ml con agua destilada para el intercambio de gases.
3. Colocar las placas de CIV dentro de la cámara de trigas y cerrarla correctamente.
4. Conectar el trigas a la cámara y colocar el tubo de salida dentro del tubo Falcon con agua destilada para el intercambio de gases.
5. Una vez que esté lista la conexión, abrir la llave del trigas e insuflar la mezcla de gases durante 1,5 a 2 minutos.
6. Al finalizar el intercambio de gases, cerrar la llave y desconectar la cámara.
7. Inmediatamente colocar la cámara dentro de la estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂).

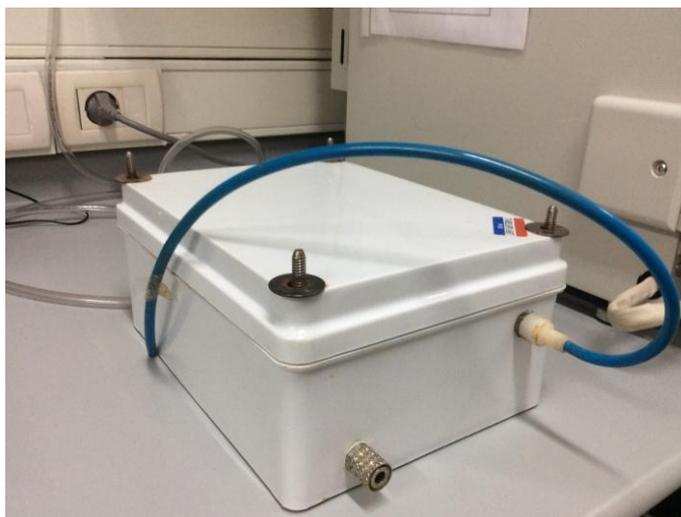


Figura 36 Fotografía cámara de trigas.

Condiciones:

- Placas de CIV: placas de Petri de 35 mm, 20-30 cigotos por gota de 100 μ l de medio SOF Desarrollo cubiertas por aceite mineral.
- Incubación en atmósfera humidificada a 39°C, 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂.

4.4.4. Evaluación de embriones

La evaluación morfológica de los embriones se realiza de acuerdo con las normas recomendadas por la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS) (Stringfellow y Seidel, 1998) descritas en el apartado 5. EVALUACIÓN DE EMBRIONES.

Procedimientos:

1. Para realizar las evaluaciones, retirar cuidadosamente las placas de Petri de CIV de la cámara de trigas.
 2. Realizar la evaluación morfológica bajo lupa estereoscópica con un aumento de 40x y registrar los estadios como lo especificado en el apartado 4.5. Protocolo de registros.
 3. Al finalizar las evaluaciones volver a realizar el procedimiento previamente descrito en el apartado 4.4.3. Cámara de trigas e incubación.
- **Día 2:** se evalúan las divisiones embrionarias, clasificando los embriones en: 2 células, 3 a 4 células y más de 4. Los resultados se expresan como tasa de clivaje.

Tasa de clivaje: número de embriones clivados/número de ovocitos puestos en MIV.

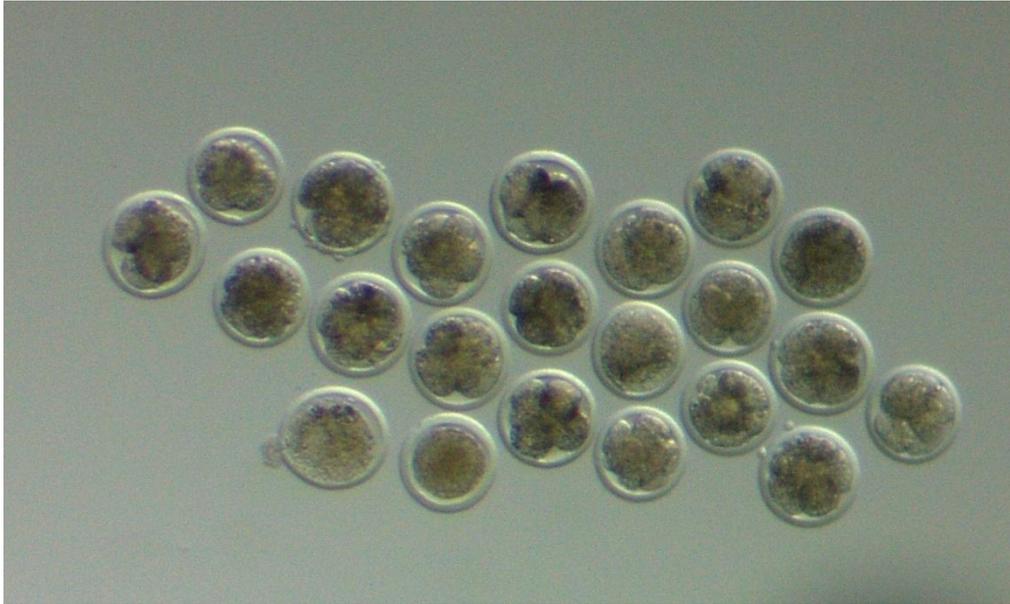


Figura 37 Fotografía de embriones evaluados al día 2. Embriones con divisiones celulares y ovocitos no fertilizados (UFOs). Fotografía tomada con lupa estereoscópica (50x).

- **Día 6:** se evalúa el desarrollo embrionario, clasificando a los embriones en: mórula, blastocisto temprano, blastocisto, blastocisto expandido. Los resultados se expresan como tasa de desarrollo y tasa de blastocisto.

Tasa de desarrollo embrionario: número de embriones desarrollados/número de ovocitos puestos en MIV.

Tasa de blastocisto: número de blastocistos total/número de ovocitos puestos en MIV.



Figura 38 Fotografía de embriones evaluados al día 6. Mórulas. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (40x).



Figura 39 Fotografía de embriones evaluados al día 6. Figura 39. Blastocistos expandidos. Fotografía tomada con lupa estereoscópica (50x)

➤ **Día 8:** se evalúa la eclosión embrionaria.

Tasa de eclosión: blastocistos eclosionados/número de blastocistos total.

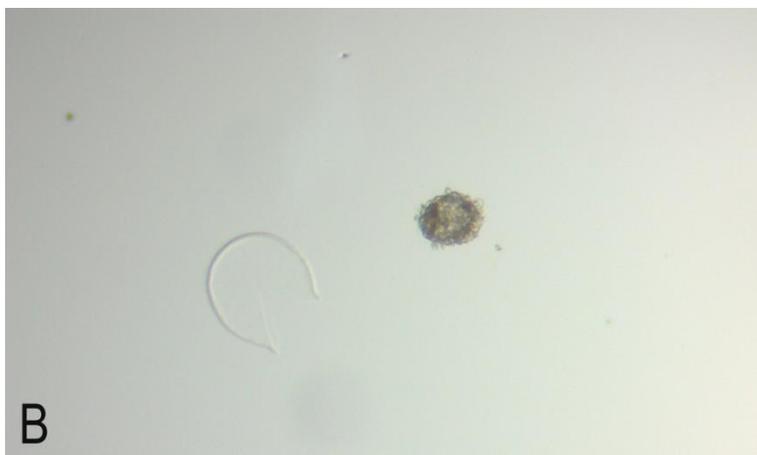
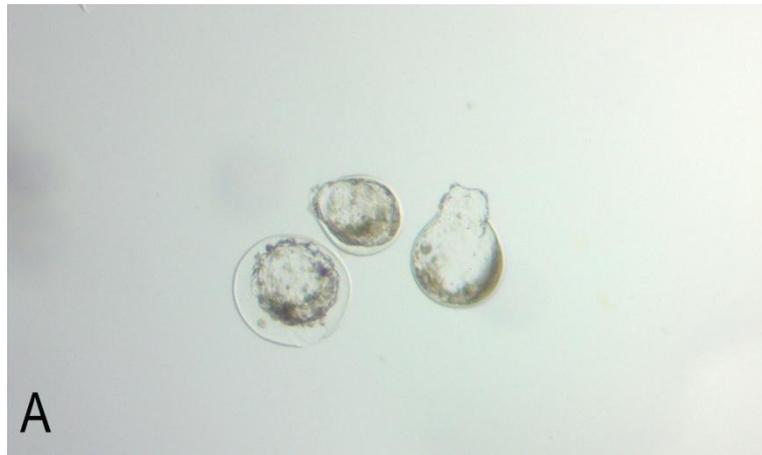


Figura 40 Fotografías de embriones evaluados al día 8. A. blastocistos en eclosión. B. blastocisto eclosionado. Fotografías tomadas con lupa estereoscópica (50x).

Brevemente se describen los estadios de desarrollo embrionario adaptado a la PIVE en ovinos en relación a los días de CIV (8 días de duración) en que se espera encontrar los diferentes estadios:

Cigoto de una célula o sin fertilizar: en el día 0 y 1.

Embriones de 2 a 12 células: días 1 a 3.

Mórula temprana: una masa de al menos 16 células. Las blastómeras individuales son difíciles de distinguir entre sí. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino. Entre el día 4 y 5 de desarrollo.

Mórula compacta: blastómeras individuales fusionadas formando una masa compacta. La masa embrionaria ocupa entre 60 a 70% del espacio perivitelino. Entre el día 5 y 6 de CIV.

Blastocisto temprano: es un embrión que ha formado una cavidad ocupada por líquido o blastocele, apariencia general de un anillo de sellar. El embrión ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino. Al principio de esta etapa, el embrión puede parecer de calidad cuestionable, ya que en este momento es difícil diferenciar la masa celular interna de las células del trofoblasto. Se espera encontrar el día 6 de CIV.

Blastocisto: en este momento del desarrollo hay una diferenciación evidente en las células del trofoblasto y el macizo celular interno (más oscuro y compacto). El blastocele es prominente y el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino. La diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna es posible en esta etapa de desarrollo y es esperable entre el día 6 y 7 de CIV.

Blastocisto expandido: el diámetro general del embrión aumenta significativamente, a su vez hay un adelgazamiento de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su grosor original. Generalmente entre el día 6 y 7 de CIV.

Blastocisto eclosionado: los embriones en esta etapa podrán estar en proceso de eclosión o pueden estar completamente desprovistos de la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o pueden colapsar. Este estadio se espera encontrar en el día 8 de CIV.

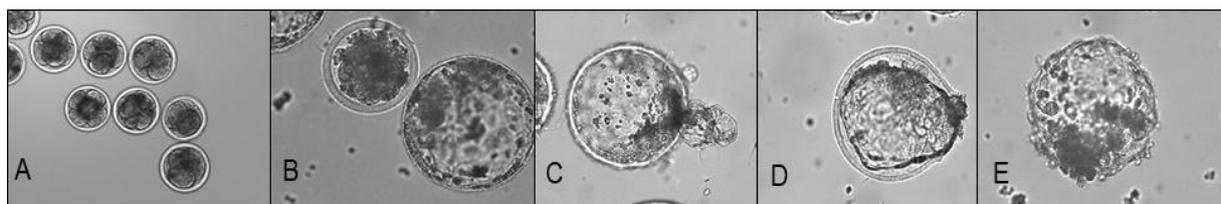


Figura 41 Fotografías de diferentes estadios de desarrollo embrionario. A. embriones clivados. B. blastocisto expandido. C. blastocisto comenzando el proceso de eclosión. D. blastocisto eclosionado. E. blastocisto eclosionado.

D. blastocisto en eclosión. E blastocisto eclosionado. Fotografías tomadas con microscopio (100 y 400x).

4.4.5. Cambio de medio

Se realiza un cambio parcial de medio del 80% del volumen de la gota de cultivo, los días 3 y 6 del desarrollo *in vitro* (figura 39).

Procedimientos:

1. Para realizar el cambio de medio, retirar cuidadosamente las placas de Petri de CIV de la cámara de trigas y mantener en la incubadora.
2. Preparar la micropipeta en volumen 80 μl (teniendo en cuenta que las gotas de CIV son de volumen 100 μl).
3. Tomar la placa de Petri de CIV n°1, bajo la lupa estereoscópica, retirar 80 μl de volumen de la gota 1 y repetir el procedimiento para todas las gotas de la placa.
4. Reponer 80 μl de medio SOF Desarrollo comenzando por la gota 1 hasta completar la reposición con medio fresco de todas las gotas de la placa.
5. Repetir el paso 3 y 4 para las sucesivas placas de CIV.
6. Realizar el procedimiento previamente descrito en el apartado 4.4.3. Cámara trigas e incubación.

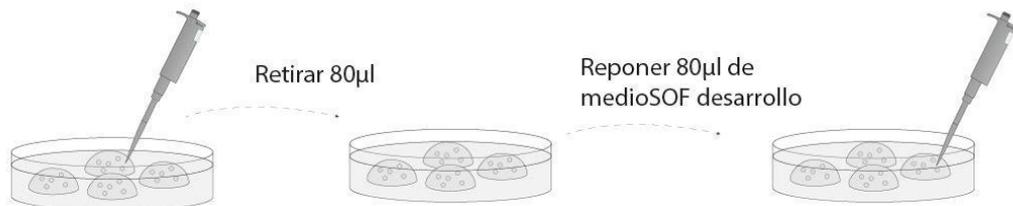


Figura 42 Cambio parcial de 80% del volumen de medio de la gota de cultivo.

4.5. REGISTROS

En la PIVE los registros se llevan a cabo en el siguiente modelo de planilla

<u>Fecundación in vitro ovinos</u>			
N° FIV:			
CO₂:		Experimento:	
Temperatura:			
Frigorífico:		Operario/s:	
<u>Ovarios</u>			Fecha:
N° ovarios:	CL:	SCL:	N° ovocitos aspirados:
Hora de colecta:			N° ovocitos viables (A y B):
Inicio aspiración:			N° ovocitos (C y D)
Fin aspiración:			Medio de aspiración/búsqueda:
Observaciones:			Raza:
<u>Maduración ovocitos</u>			Fecha:
N° ovocitos:	Grupo		Gota
Hora inicio:	Placa 1		N°
Hora fin:			
Medio de maduración:			
Observaciones:	Placa 2		
<u>Semen</u>			Operario/s:
Raza carnero:			Fecha:
Partida semen:			<u>Evaluación semen:</u>
N° Pajuelas:			Concentración:
Medio de capacitación:			Motilidad:
Hora inicio: Hora Fin:			Dosis:
			Método de selección:
<u>Fecundación</u>			Operario/s:
Medio de fertilización (lote; fecha de elaboración):			Fecha:
Hora inicio:			
<u>Desarrollo</u>			Operario/s:
Medio de desarrollo (lote; fecha de elaboración):			Fecha:
Hora inicio:			
Hora fin:			

4.6. ELABORACION DE MEDIOS DE CULTIVO

4.6.1. Preparación de medios

Materiales y equipo:

1. Alcohol 70°
2. Balanza de precisión
3. Cabina de flujo laminar
4. Filtros de jeringa de 0,22 µm de diámetro de poro
5. Gradilla
6. Guantes de látex sin polvo
7. Jeringas de plástico sin émbolo 5 ml
8. Material para pesaje: espátula
9. Micropipetas volumen variable y punteros
10. Papel toalla
11. Pipetas de vidrio graduadas 25 ml
12. Tubos Eppendorf 2 ml
13. Tubos Falcon 50 ml y 15 ml
14. Túnica, tapabocas y cofia

4.6.1.1. Preparación medio de Recuperación

Materiales específicos:

1. Medio 199⁽¹³⁾ 20 ml
2. Penicilina-estreptomicina alícuota de 100 µl para medio de Recuperación (10000 µg/ml; 10000 UI/ml), almacenado a -20°C
3. SFB⁽²²⁾ (1%) 200 µl, refrigerado a 5°C
4. Heparina (5 UI/ml) alícuota de 56,5 µl para medio de Recuperación, almacenado a -80°C
5. HEPES⁽⁹⁾ (25 mM) 0,119 g

Procedimientos:

1. Previamente, pesar 0,119 g de HEPES, en un tubo Eppendorf rotulado.
2. Descongelar penicilina-estreptomicina y heparina para medio de Recuperación.
3. Para preparar el medio de Recuperación, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 20 ml de medio 199 en un tubo Falcon de 50 ml.
4. Disolver 0.119 g de HEPES.
5. Homogeneizar.
6. Agregar en el siguiente orden:
 - 100 µl de penicilina- estreptomicina
 - 200 µl de SFB
 - 56,6 µl de heparina
7. Homogeneizar.

8. Filtrar en tubos Falcon de 15 ml, rotulados y con fecha de preparación.
9. Almacenar los tubos Falcon con medio de Recuperación refrigerados a 5°C.

Nota:

Mantener el medio de Recuperación refrigerado y sellado con parafilm.

Precalear previo a su utilización.

4.6.1.2. Preparación medio de Búsqueda

Materiales específicos:

1. HEPES⁽⁹⁾ 25 mM 0,298 g
2. Medio 199⁽¹³⁾ 50 ml
3. Penicilina-estreptomicina alícuota de 250 µl para medio de Búsqueda (10000 µl/ml; 10000 UI/ml), almacenado a -20°C
4. SFB⁽²²⁾ (1%) 500 µl, almacenado a 5°C

Procedimientos:

1. Previamente, pesar 0,298 g de HEPES, en un tubo Eppendorf rotulado.
2. Descongelar penicilina-estreptomicina para medio de Búsqueda.
3. Para preparar el medio de Búsqueda, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 50 ml de medio 199 en un tubo Falcon de 50 ml.
4. Disolver 0,298 g de HEPES.
5. Homogeneizar.
6. Agregar en el siguiente orden:
 - 250 µl de penicilina-estreptomicina
 - 500 µl de SFB
7. Homogeneizar.
8. Filtrar en tubos Falcon de 15 ml, rotulados y con fecha de preparación.
9. Almacenar los tubos Falcon con medio de Búsqueda refrigerados a 5°C.

Nota:

Mantener el medio de Búsqueda refrigerado, sellado con parafilm.

Precalear previo a su utilización.

4.6.1.3. Preparación medio de Maduración

Materiales específicos:

1. Cisteamina (100 µM) alícuota de 10 µl, almacenado -20°C
2. Medio 199⁽¹³⁾ 8,710 ml
3. Penicilina-estreptomicina alícuota de 100 µl para medio de Maduración (10000 µg/ml; 10000 UI/ml), almacenado a -20°C
4. FSH (10 µg/ml) alícuota de 100 µl, almacenado a -80°C

5. LH (10 µg/ml) alícuota de 80 µl, almacenado a -80°C
6. SOE (10%) alícuota de 1 ml, almacenado a -80°C

Procedimientos:

1. Descongelar penicilina-estreptomicina para medio de Maduración, cisteamina, SOE, FSH y LH.
2. Para preparar el medio de Maduración, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 8, 710 ml de medio 199 en un tubo Falcon de 15 ml.
3. Agregar en el siguiente orden:
 - 100 µl de penicilina-estreptomicina
 - 1 ml de SOE
 - 100 µl de FSH
 - 80 µl de LH
 - 10 µl de cisteamina
4. Homogeneizar.
5. Filtrar en un tubo Falcon de 15 ml, rotulado y con fecha de preparación.
6. Almacenar el tubo Falcon con medio de Maduración con tapa abierta en estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂).

Nota:

Equilibrar el medio de Maduración destapado en estufa de incubación (39°C, 5% CO₂) por un mínimo de 2 h previo su utilización.

Almacenar a 5°C el SOE sobrante para utilizar en la preparación de medio de Fertilización.

4.6.1.4. Preparación medio de Fertilización

Materiales específicos:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 7,630 ml
2. Heparina (10 µg/ml) alícuota de 10 µl, almacenado a - 80°C
3. Hipotaurina (1 µg/ml) alícuota de 5 µl, almacenado a -80°C
4. SOE (2%) 200 µl, refrigerado a 5°C
5. Stock A 1000 µl
6. Stock B 1000 µl
7. Stock C 70 µl
8. Stock D 100 µl

Procedimientos:

1. Descongelar heparina e hipotaurina para medio SOF Fertilización.
2. Para preparar el medio SOF Fertilización, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 7,630 de agua ultra en un tubo Falcon de 15 ml.
3. Agregar en el siguiente orden:

- 1000 µl de stock A
 - 1000 µl de stock B
 - 70 µl de stock C
 - 100 µl de stock D
 - 200 µl de SOE
 - 10 µl de heparina
 - 5 µl de hipotaurina
4. Homogeneizar.
 5. Filtrar en un tubo Falcon de 15 ml, rotulado y con fecha de preparación.
 6. Almacenar el tubo Falcon con medio SOF Fertilización con tapa abierta en estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂).

Nota:

Equilibrar el medio SOF Fertilización destapado en estufa de incubación (39°C, 5% CO₂) por un mínimo de 2 h previo su utilización.

4.6.1.5. Preparación medio de Desarrollo

Materiales específicos:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 6,830 ml
2. Aminoácidos: BME⁽²⁾ 500 µl y MEM⁽¹⁴⁾ 500 µl, refrigerado a 5°C
3. BSA⁽³⁾ (0,4%) 0,04g, almacenado a 5°C
4. Stock A 1000 µl
5. Stock B 1000 µl
6. Stock C 70 µl
7. Stock D 100 µl

Procedimientos:

1. Previamente, pesar 0.04 g de BSA.
2. Para preparar el medio SOF Desarrollo, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 6, 830 ml de agua ultra pura en un tubo Falcon de 15 ml.
3. Agregar en el siguiente orden:
 - 1000 µl de stock A
 - 1000 µl de stock B
 - 70 µl de stock C
 - 100 µl de stock D
 - 500 µl de BME
 - 500 µl de MEM
4. Homogeneizar.
5. Disolver 0,04 g de BSA.
6. Homogeneizar.
7. Filtrar en un tubo Falcon de 15 ml, rotulado y con fecha de preparación.

- Almacenar el tubo Falcon con medio SOF Desarrollo con tapa abierta en estufa de incubación humidificada (39°C, 5% CO₂).

Nota:

Equilibrar el medio SOF Desarrollo destapado en estufa de incubación (39°C, 5% CO₂) durante toda la noche.

4.6.2. Preparación de placas de cultivo

Materiales y equipo:

1. Aceite mineral⁽¹⁵⁾
2. Alcohol 70°
3. Cabina de flujo laminar
4. Gradilla
5. Guantes de látex sin polvo
6. Medio preparado y filtrado
7. Micropipetas de volumen variable y punteros
8. Papel toalla
9. Placas de Petri de 35 mm
10. Túnica, tapabocas y cofia

Procedimientos:

Preparar las placas de MIV, FIV y CIV como lo explicado en el siguiente procedimiento:

1. Identificar la placa de Petri. Colocar el n° de placa, la fecha, grupo y etapa del procedimiento: MIV, FIV o CIV; indicar con una flecha debajo de la placa donde comienza la gota n°1, el sentido de las gotas siempre será horario.
2. Utilizando una micropipeta, realizar una gota de 50 µl de medio en el lugar que está indicado con la flecha y continuar en sentido horario hasta completar 4 gotas.
3. Verter aproximadamente 4 ml de aceite mineral en la placa utilizando una micropipeta.
4. Completar las gotas, agregando 50 µl de medio por cada gota (figura 44).

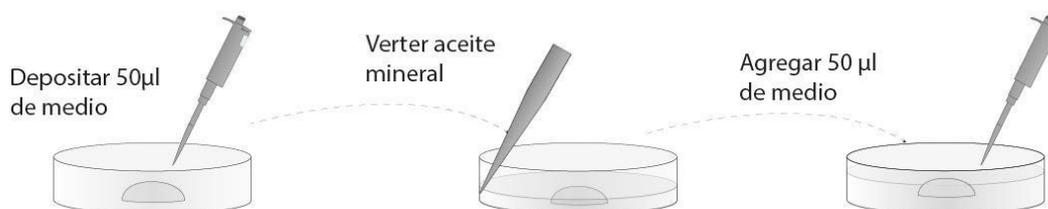


Figura 44 Esquema de preparación de placas de cultivo.

5. Al finalizar el procedimiento, incubar las placas de cultivo y el medio utilizado en la estufa de incubación humidificada a (39°C, 5% CO₂).

Nota:

El medio a utilizar será de medio de Maduración, SOF Fertilización o SOF Desarrollo.

4.6.3. Soluciones stock

Materiales y equipo:

1. Alcohol 70°
2. Cabina de flujo laminar
3. Filtros de jeringa de 0,22 µm de diámetro de poro
4. Gradilla
5. Guantes de látex sin polvo
6. Jeringas con émbolo plástico 5 ml
7. Micropipetas volumen variable y punteros
8. Papel toalla
9. Pipetas de vidrio graduadas 25 ml
10. Tubos falcon 15 ml
11. Túnica, tapabocas y cofia

4.6.3.1. Preparación stock A

Materiales específicos:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 9,940 ml
2. KCl⁽²⁰⁾ 0,534 g
3. KH₂PO₄⁽²¹⁾ 0,0162 g
4. Lactato de Na⁽²⁵⁾ 60 µl
5. MgSO₄7H₂O⁽¹²⁾ 0,0182 g
6. NaCl⁽²⁴⁾ 0,629 g
7. Penicilina G⁽¹⁶⁾ 0,006 g

Procedimientos:

1. Previamente, pesar en tubos Eppendorf rotulados:
 - 0,629 g de NaCl
 - 0,534 g de KCl
 - 0,0162 g de KH₂PO₄
 - 0.0182 g MgSO₄7H₂O
 - 0,006 g de Penicilina G⁽¹⁶⁾
2. Para preparar el stock A, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 9,940 ml de agua ultra pura en un tubo Falcon de 15 ml.
3. Agregar en el siguiente orden:
 - 0,629 g de NaCl

- 0,0534 g de KCl
 - 0,0162 g de KH_2PO_4
 - 0,0182 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0,006 g de Penicilina G⁽¹⁶⁾
4. Homogeneizar.
 5. Agregar 60 μl de Lactato de Na.
 6. Homogeneizar.
 7. Filtrar a un tubo Falcon de 15 ml, rotulado y con fecha de preparación.

4.6.3.2. Preparación stock B

Materiales específicos:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 10 ml
2. NaHCO_3 ⁽²³⁾ 0,210 g
3. Rojo fenol⁽¹⁹⁾ (0,003 μM) 2,1 μl

Procedimientos:

1. Previamente, pesar 0,210 g de NaHCO_3 en un tubo Eppendorf rotulado.
2. Para preparar el stock B, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 10 ml de agua ultra pura en un tubo Falcon de 15 ml.
3. Disolver 0,210 g de NaHCO_3 .
4. Homogeneizar.
5. Agregar 2,1 μl de rojo fenol.
6. Homogeneizar.
7. Filtrar a un tubo Falcon de 15 ml, rotulado y con fecha de preparación.

4.6.3.3. Preparación stock C

Materiales específicos:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 10 ml
2. Piruvato de Na⁽²⁷⁾ 0,051 g refrigerado a 5°C

Procedimiento:

1. Previamente, pesar 0,051 g de Piruvato de Na en un tubo Eppendorf rotulado.
2. Para preparar el stock C, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 10 ml de agua ultra pura en un tubo Falcon de 15 ml.
3. Agregar 0,051 g de Piruvato de Na.
4. Homogeneizar.
5. Filtrar a un tubo Falcon de 15 ml, rotulado y con fecha de preparación.

4.6.3.4. Preparación stock D

Materiales específicos:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 10 ml
2. CaCl₂H₂O⁽⁴⁾ 0,262 g

Procedimiento:

1. Previamente, pesar 0,262 g de CaCl₂H₂O en un tubo Eppendorf rotulado.
2. Para preparar el stock D, colocar con una pipeta graduada de 25 ml, 10 ml de agua ultra pura en un tubo Falcon de 15 ml.
3. Agregar 0,262 g de CaCl₂H₂O.
4. Homogeneizar.
5. Filtrar a un tubo Falcon de 15 ml, rotulado y con fecha de preparación

Nota:

Almacenar las soluciones stock refrigeradas a 5°C, durante 3 semanas.

4.6.4. Almacenamiento/Alícuotas

4.6.4.1. Antibióticos

4.6.4.1.1. Penicilina G frigorífico

Materiales:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 5 ml
2. Micropipetas volumen variable y punteros
3. Penicilina G⁽¹⁷⁾ 5.000.000 UI
4. Tubos Eppendorf 2 ml

Procedimiento:

1. Reconstituir la penicilina G con 5 ml de agua ultra pura.
2. Homogeneizar la mezcla
3. Hacer alícuotas de 500 µl ó 1000 µl, dependiendo de la presentación del solución fisiológica de NaCl⁽²⁷⁾ a utilizar (500 ml o 1 lt). Rotular y almacenar en -20°C.

4.6.4.1.2. Penicilina-estreptomicina para medios de Recuperación, Búsqueda y Maduración

Materiales:

1. Micropipetas volumen variable y punteros
2. Penicilina-estreptomicina⁽¹⁸⁾ (10000 µg/ml, 10000 UI/ml)
3. Tubos Eppendorf 2 ml
4. Tubos Falcon 15 ml

Procedimiento:

1. Presentación penicilina-estreptomicina en 100 ml, realizar alícuotas en tubos Falcon 15 ml. Rotular y almacenar en -20°C.
2. Para realizar alícuotas para los medios de Recuperación, Búsqueda y Maduración, descongelar una alícuota de 15 ml a temperatura ambiente y realizar alícuotas de:
 - Recuperación: 250 µl
 - Búsqueda: 100 µl
 - MIV: 100 µl
3. Rotular y almacenar en -20°C.

4.6.4.2. Cisteamina

Materiales:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 1 ml
2. Cisteamina⁽⁶⁾
3. Micropipetas volumen variable y punteros
4. Tubos Eppendorf 2 ml

Procedimiento:

1. Preparar una solución madre de 100 mM (0,1 M) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{gramos de soluto} = \text{concentración deseada} \times \text{volumen final} \times \text{peso molecular}$$

$$0,1 \text{ moles/l} \times 0,001 \text{ l} \times 77,15 \text{ g/mol} = 0,0077 \text{ g} = 7,7 \text{ mg}$$
2. Hacer alícuotas para medio de Maduración de 10 µl (concentración final en medio de Maduración de 100 µM).
3. Rotular y almacenar en -20°C.

4.6.4.3. Heparina

Materiales:

1. Heparina⁽⁸⁾ 10 KU
2. Micropipetas volumen variable y punteros
3. PBS
4. Tubos Eppendorf

Procedimiento:

1. Hacer una dilución de 10 mg/ml en PBS.
2. Hacer alícuotas para medio SOF Fertilización de 10 µl y para medio de Recuperación de 60 µl.
3. Rotular y almacenar en -80°C.

4.6.4.4. Hipotaurina

Materiales:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 5ml
2. Hipotaurina⁽¹⁰⁾ 10 mg
3. Micropipetas volumen variable y punteros
4. Tubos Eppendorf 1,5 ml

Procedimientos:

1. Para preparar una solución stock de 2 mg/ml, agregar 5 ml de agua ultra pura a la hipotaurina 10 mg/ml.
2. Homogeneizar.
3. Alicuotar y rotular stocks de 2 mg/ml, almacenar a -80°C.
4. Realizar alícuotas de 5 µl para medio SOF Fertilización (concentración final de 1µg/ml en medio).
5. Rotular y almacenar a -80°C.

4.6.4.5. Hormonas

4.6.4.5.1. FSH

Materiales:

1. FSH⁽⁷⁾ (contiene 400 mg de NIH-FSH-P1)
2. Micropipetas volumen variable y punteros
3. PBS
4. Tubos Eppendorf 1,5 ml
5. Tubos Falcon 15 ml

Procedimiento:

1. Agregar 17,6 ml de diluyente en el frasco de la hormona. La solución madre tendrá una concentración de 22,7 mg/ml.
2. Hacer alícuotas de 100 µl de la solución madre, rotular y almacenar en -80°C.
3. A partir de una alícuota de 100 µl de solución madre, agregar 2,27 ml de PBS (concentración de 1 mg/ml) y hacer alícuotas para medio de Maduración de 100 µl (concentración final en medio de Maduración de 10 µg/ml). Rotular y almacenar en -80°C.

4.6.4.5.2. LH

Materiales:

1. Agua ultra pura⁽¹⁾ 12,48 ml
2. LH⁽¹¹⁾
3. Micropipetas volumen variable y punteros
4. Tubos Eppendorf 2 ml
5. Tubos Falcon 15 ml

Procedimiento:

1. Disolver 15,60 mg en 12,48 ml de agua ultra pura. La solución madre tendrá una concentración de 1,25 mg/ ml.
2. Alicuotar la cantidad obtenida en tubos Eppendorf, rotular y almacenar en -80°C.
3. Hacer alícuotas para medio de Maduración de 80 µl, rotular y almacenar en -80°C.

4.6.4.6. Buffer fosfato salino

Materiales:

1. Agua destilada
2. 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4^{(26)}$
3. 0,2 g de $\text{KCl}^{(19)}$
4. 0,24 g $\text{KH}_2\text{PO}_4^{(20)}$
5. 8 g de $\text{NaCl}^{(23)}$
6. Autoclave
7. Frasco de vidrio estéril autoclavable
8. Micropipetas de volumen variable y punteros
9. Tubos Eppendorf 2 ml

Procedimiento:

1. Pesar las siguientes cantidades de sales en tubos Eppendorf individuales:
 - 8 g de NaCl
 - 0,2 g de KCl
 - 1,44 g de Na_2HPO_4
 - 0,24 g de KH_2PO_4
2. Disolver las sales en 800 ml de agua destilada.
3. Ajustar el pH a 7.4.
4. Ajustar el volumen a 1 lt con agua destilada adicional.
5. Esterilizar por autoclave (20 min, 121°C, ciclo líquido).

4.6.4.7. Sueros

4.6.4.7.1. Suero fetal bovino

El suero es un complejo suplemento utilizado en los medios de PIVE, contiene mayormente proteínas pero también contiene factores de crecimiento, hormonas, aminoácidos, glucosa, inhibidores de tripsina, lípidos, entre otros. El más comúnmente utilizado es el SFB. Más allá de aportar nutrientes básicos al medio, también protege de los efectos tóxicos asociados a cambios de pH, presencia de metales pesados, endotoxinas y actividad de proteólisis.

Como bien se sabe el suero es un producto obtenido de sangre, la cual contiene el sistema de complemento que puede conducir a una lisis celular. Para eliminar este riesgo, el sistema de complemento debe ser inactivado. La inactivación por calor destruye el sistema de complemento pero también destruye factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y hormonas inestables al calor que están presentes en el suero, que ocurre cuando el tratamiento por calor es prolongado o la temperatura es superior a 56°C.

El SFB comercial generalmente es inactivado, por lo que es importante verificar que se haya realizado el procedimiento. El tratamiento por calor puede realizarse como en el siguiente procedimiento sugerido.

Materiales:

1. Baño María a 56°C
2. Micropipetas de volumen variable y punteros
3. Pipeta Pasteur 20 ml
4. SFB
5. Tubos Falcon para realizar alícuotas

Procedimiento:

1. Para comenzar el proceso de inactivación por calor, preparar un baño María a 56°C.
2. Una vez que el suero esté completamente descongelado, homogeneizar el suero y colocarlo en el baño María por 30 minutos.
3. Durante el procedimiento, homogeneizar el suero a cada 5 minutos para asegurar que todo el contenido sea inactivado.
4. Al finalizar el tiempo de inactivación, retirar el suero y realizar alícuotas con un volumen adecuado para la posterior utilización. Las alícuotas deben estar correctamente identificadas, colocando la fecha y número de lote. Almacenar a -20°C.

Nota:

Para prevenir la desnaturalización de proteínas:

- No incrementar la velocidad de descongelado utilizando temperaturas mayores a 25°C en aire, o 37°C en baño María.
- No calentar el suero inactivado que está parcialmente descongelado.
- No realizar la inactivación más allá de los 30 minutos.
- Mezclar el suero durante el proceso de inactivación.

4.6.4.7.2. Suero de oveja en estro

El SOE es obtenido a partir de sangre colectada de ovejas en estro. El suero es la fracción líquida de la sangre luego de permitir la coagulación. Mediante la

centrifugación se separa el coágulo del suero, como se describe en el siguiente procedimiento.

Materiales:

1. Centrífuga refrigerada
2. Micropipetas de volumen variable y punteros
3. Tubo de colecta (tubo de ensayo o comercial)
4. Tubos Eppendorf 2 ml
5. Tubos Falcon 15 ml

Procedimiento de preparación del SOE:

1. Colectar sangre en un tubo de colecta.
2. Luego de la colecta, permitir la coagulación a temperatura ambiente. Usualmente ocurre en 15 a 30 minutos.
3. Remover el coágulo mediante centrifugación a 1000-2000 x g durante 10 minutos.
4. Al finalizar la centrifugación el sobrenadante obtenido es el suero, inmediatamente se transfiere el sobrenadante obtenido a un tubo Falcon para posteriormente ser alicuotado.
5. Realizar alícuotas de 1,5 ml utilizando tubos Eppendorf previamente rotulados y con fecha de preparación, almacenar en -80°C.

Nota:

Evitar los procesos de congelación y descongelación de suero, ya que es detrimental para varios componentes del suero.

La utilización de muestras hemolizadas, ictéricas o lipémicas pueden invalidar resultados.

5. EVALUACION DE EMBRIONES

La evaluación embrionaria es un importante capítulo en la PIVE, la cual indica la viabilidad de los embriones al momento de la transferencia o antes de la criopreservación, en este sentido es importante establecer un procedimiento apropiado de clasificación en el laboratorio.

Existen varios métodos de evaluación de calidad embrionaria, como tinciones, medidas de actividad enzimática, absorción de glucosa, entre otras. La mayoría de los protocolos que se llevan a cabo para la evaluación embrionaria se basan en una evaluación morfológica subjetiva, a partir de las normas establecidas por la IETS (Stringfellow y Seidel, 1998). El principal objetivo de esta institución es proveer una plataforma de intercambio y difusión de información relacionada a la transferencia embrionaria y tecnologías asociadas, además de información técnica acerca de las regulaciones sanitarias para el comercio internacional de embriones.

Para certificación e identificación embrionaria la IETS propone los siguientes códigos numéricos para la etapa de desarrollo (1 al 9) (Figura 45) y calidad del embrión (1 al 4):

5.1. Estadío de desarrollo embrionario

Código numérico	Estadío
1	No fertilizado
2	2 a 16 células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto eclosionado
9	Blastocisto eclosionado re expandido

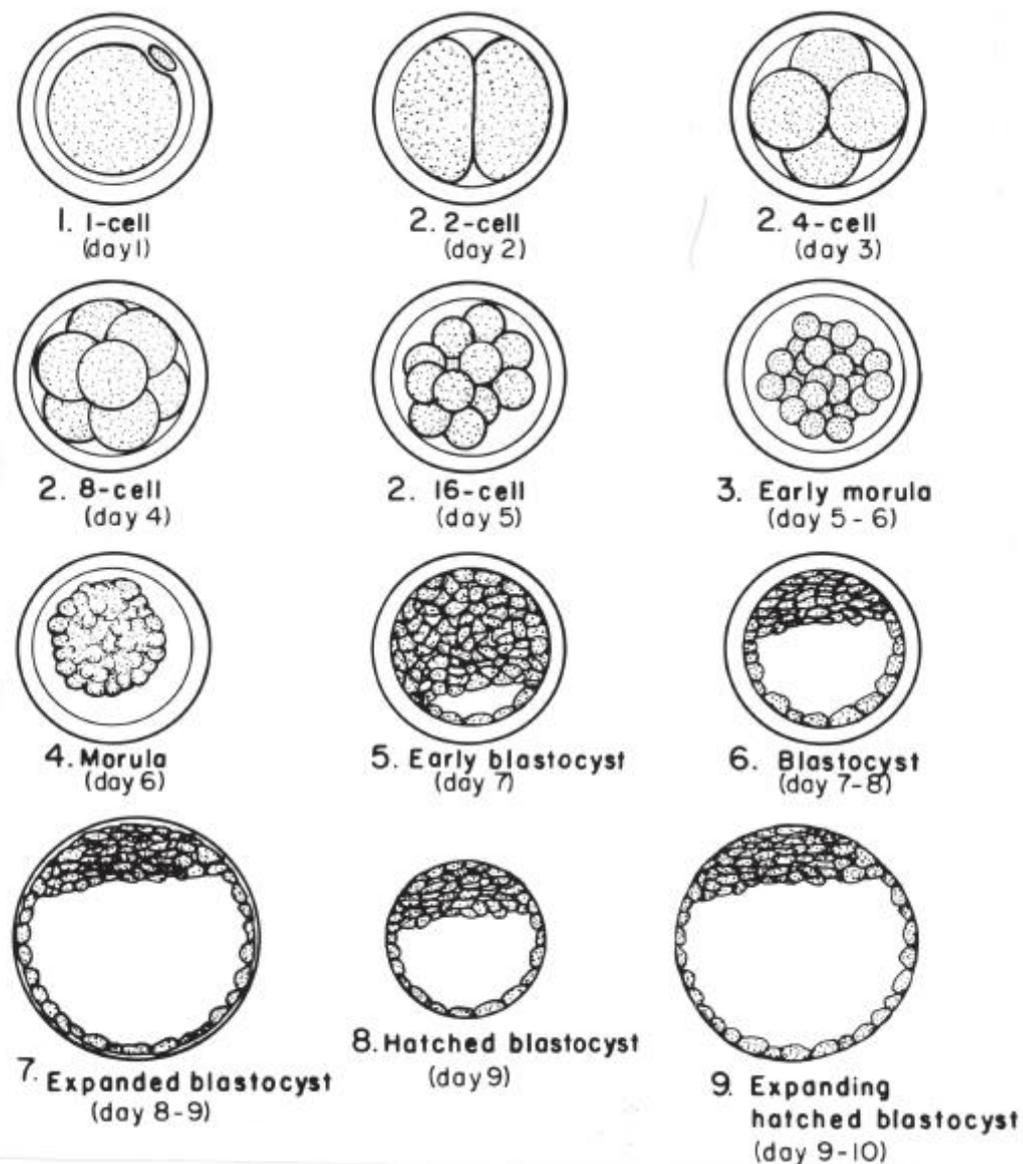


Figura 45 Códigos numéricos para las diferentes etapas de desarrollo embrionario. La numeración corresponde a los códigos de estadio de desarrollo embrionario en bovinos, considerando los días después de la FIV en que se esperan encontrar. Fuente: Stringfellow DA y Seidel SM (1998).

5.2. Calidad embrionaria

Código 1 Excelente o bueno

- Masa embrionaria simétrica y esférica.
- Blastómeras individuales uniformes en tamaño, color y densidad.
- Citoplasma uniforme.
- Embrión consistente con su etapa de desarrollo esperada.
- Irregularidades menores, con al menos 85% del material celular intacto y viable.
- La zona pelúcida debe ser lisa y no tener superficies cóncavas o planas que puedan hacer que el embrión se adhiera a una placa de Petri o pajueta.

Código 2 Regular

- Irregularidades moderadas en la masa embrionaria o en tamaño, color y densidad de células individuales.
- Al menos 50% del material celular intacto y viable.

Código 3 Pobre

- Mayores irregularidades en la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales.
- Al menos 25% del material celular intacto y viable.

Código 4 Muerto o degenerado

- Embriones degenerando, ovocitos que no fertilizaron o embriones de 1 célula.

Los embriones de grado 1 sobreviven bien al procedimiento de congelación y descongelación, son aptos para el comercio internacional; mientras que los grados 2 y 3 deben transferirse frescos a receptoras adecuadas. La decisión de que si un embrión merece ser transferido o congelado, y si el embrión es apto para la exportación depende de la experiencia del evaluador de embriones.

5.3. Guía de evaluación embrionaria: ejemplos de estadios de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos (Fuente: Stringfellow DA y Seidel SM, 1998).

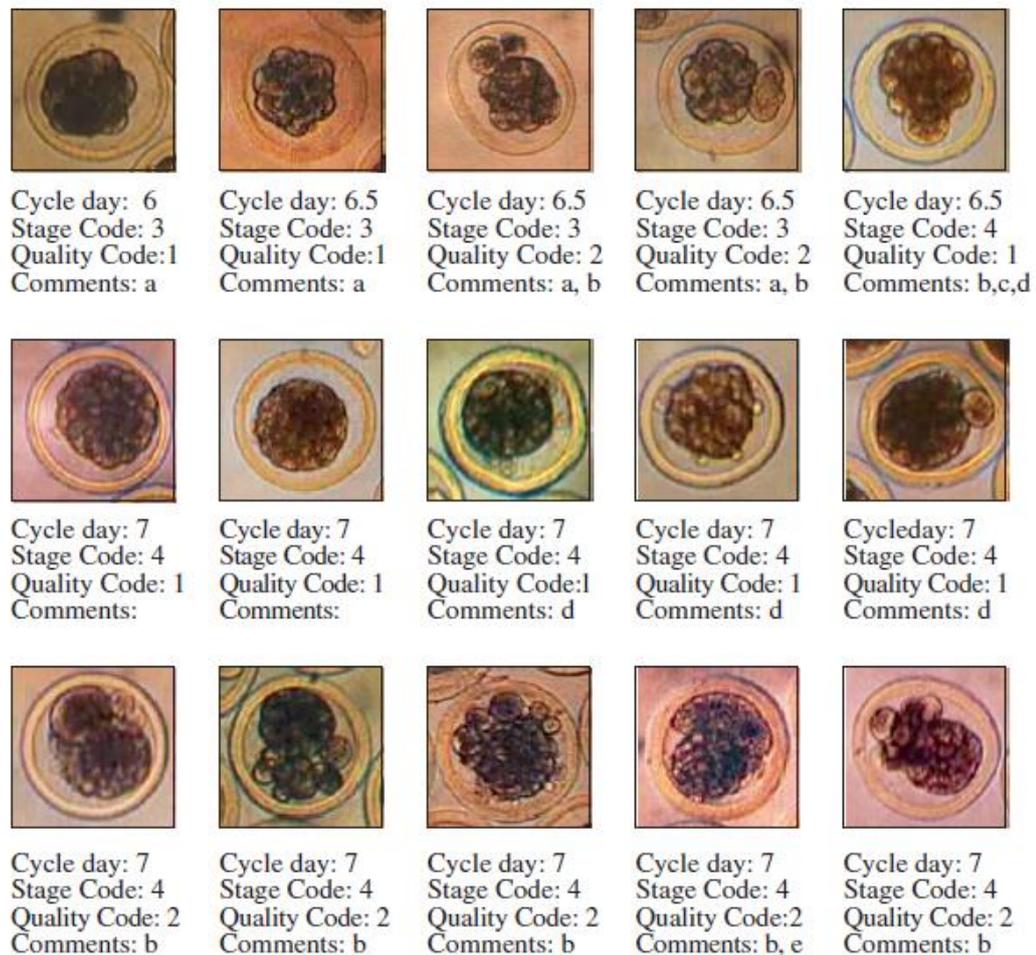


Figura 46 Guía de evaluación embrionaria: estadios de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos. Parte A.

Comentarios:

- Si el embrión es colectado en el día 7 o después, el estadio no es consistente con lo esperado y por lo tanto el código de calidad deberá ser menor.
- Las células que se extruyen de la masa embrionaria antes del estadio de 16 células constituyen más del 15% del material celular total.
- Blastómeras grandes e individuales indican que la compatación no es completa e indica in estadio 4 temprano.
- Pequeños fragmentos o blastómeras internas extruídas comprenden menos del 15% del material celular total y el embrión es consistente con el estadio de desarrollo.
- Espmatozoide en la zona pelúcida.

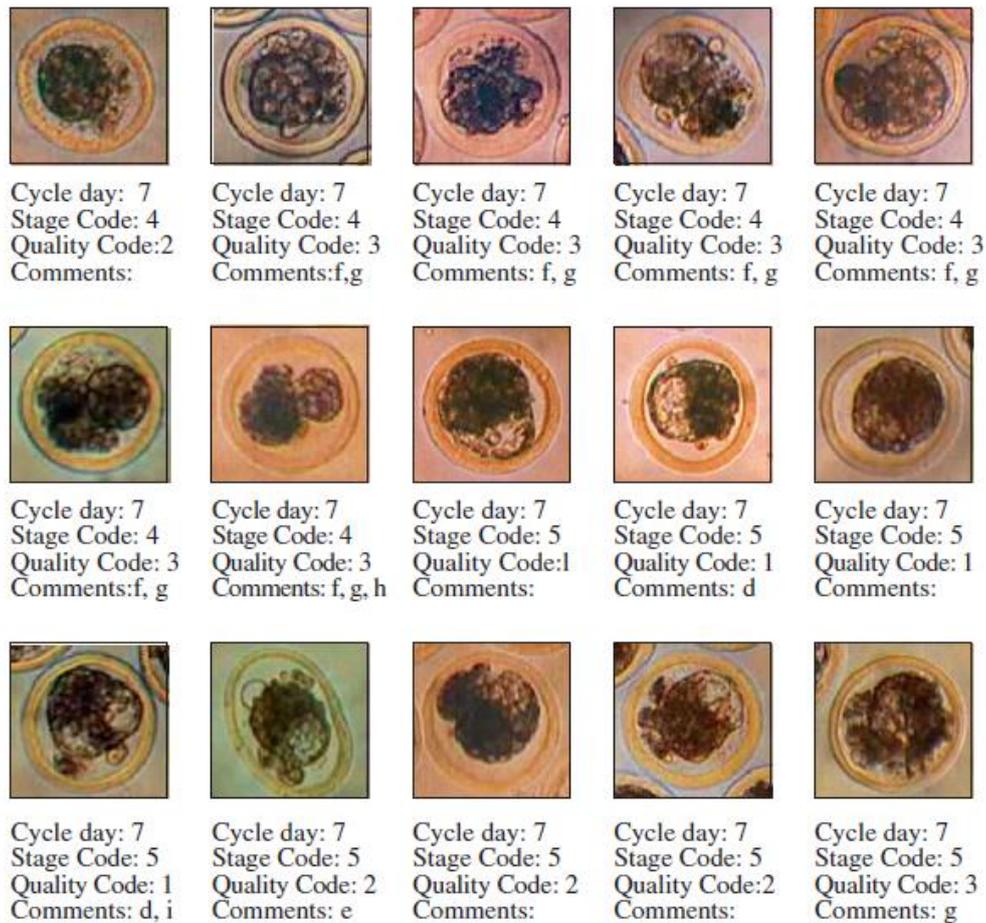


Figura 47 Guía de evaluación embrionaria: estadios de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos. Parte B.

Comentarios:

- d. Las blastómeras o pequeños fragmentos comprenden menos del 15% del material celular total y el embrión es consistente con la etapa de desarrollo esperada.
- e. Espermatozoide en la zona pelúcida.
- f. Los embriones con muchas células o fragmentos extruidos deben manipularse cuidadosamente para determinar la presencia y calidad de cualquier masa embrionaria
- g. Los embriones del código de calidad 3 tienen una masa embrionaria que es menor al 50% de todo el material celular dentro de la zona pelúcida.
- h. Este embrión tiene una masa celular buena pero pequeña. Si la masa embrionaria es inferior al 25% del material celular, debe recibir el código de calidad 4 (no viable).
- i. La forma irregular es una variación común en el desarrollo del blastocele.

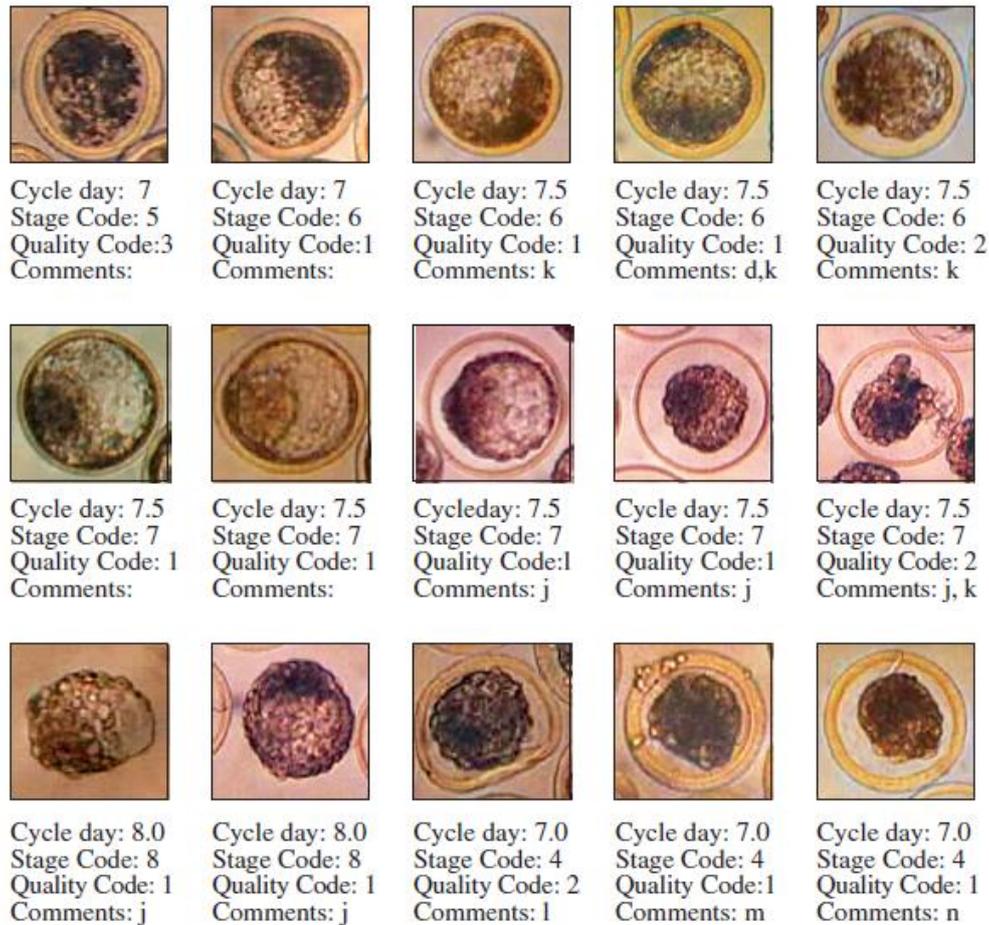


Figura 48 Guía de evaluación embrionaria: estadios de desarrollo embrionario y calidad de embriones bovinos. Parte C.

Comentarios:

d. Las blastómeras o pequeños fragmentos comprenden menos del 15% del material celular total y el embrión es consistente con la etapa de desarrollo esperada.

j. El colapso del blastocele se considera un proceso fisiológico normal que no debe bajar el código de calidad.

k. Las células extruidas en los embriones de código de etapa 6, 7 y 8 a menudo ejercen presión contra la zona pelúcida, no es normal a menos que el embrión se haya colapsado debido a la fisiología normal procesos o cuando se introduce un aditivo crioprotector.

1. Este embrión tiene una superficie plana (incluso cóncava) de la zona pelúcida que puede hacer que el embrión se pegue a una placa de Petri o pajueta. Este defecto evita que el embrión sea clasificado como código de calidad 1 y no puede utilizarse en el comercio internacional a menos que los acuerdos permiten embriones distintos del código de calidad 1.

m. Los restos celulares en la superficie de la zona pelúcida muestran que este embrión no ha sido lavado por procedimientos adecuados.

n. Este embrión tiene una zona pelúcida agrietada en la parte superior de la imagen. Los embriones que no tienen una zona pelúcida intacta no deben utilizarse en el comercio internacional.

6. RECOMENDACIONES GENERALES

6.1. Higiene general y control de calidad: buenas prácticas en un laboratorio de producción de embriones

En la PIVE es esencial mantener las buenas prácticas de laboratorio durante los procedimientos, además del saneamiento de laboratorio y control de calidad. Las medidas de control de calidad tomadas afectan a los embriones, ya sea directamente sobre el embrión o indirectamente en la higiene general en el laboratorio. Por lo tanto, mantener la limpieza general, realizar técnicas asépticas y ser consistentes al realizar los procedimientos, son consideraciones que deben ser tenidas en cuenta. Las siguientes medidas preventivas tienen en cuenta recomendaciones realizadas por la IETS (Stringfellow y Seidel, 1998).

6.1.1. Higiene en el laboratorio

Cualquier elemento en el laboratorio es un potencial fuente de contaminación. Debe prohibirse comer o beber en el laboratorio; asimismo, distracciones como conversaciones deben desanimarse mientras se está trabajando con embriones. Idealmente, el laboratorio debe ser designado solamente para el manejo de embriones y dentro de este, los siguientes puntos deben ser considerados:

- **Ambiente de laboratorio.** El acceso debe ser limitado a miembros regulares de la unidad para reducir las fuentes de contaminación exterior. La entrada debe tener alfombra de piso para reducir la suciedad del calzado, en forma alternativa se pueden utilizar fundas de zapatos descartables o un cambio de calzado al ingresar al laboratorio. El techo y las paredes del laboratorio deben estar contruidos con materiales no porosos, las superficies deben sellarse para reducir el ingreso de polvo o cualquier acceso por donde puedan ingresar plagas. Un programa de control de plagas ayudará a eliminar la contaminación desde afuera introducida por roedores e insectos. Deben utilizarse filtros de partículas de aire de alta eficiencia (HEPA) en el sistema de ventilación de aire. Igualmente, muchos compuestos gaseosos e inorgánicos, tales como compuestos orgánicos volátiles, pequeñas moléculas inorgánicas permanecen en el aire. Las ventanas y puertas deben mantenerse cerradas y selladas, especialmente cuando se está manipulando embriones o realizando procedimientos. La limpieza de las superficies debe realizarse regularmente con desinfectantes, ya que el polvo y suciedad que contiene microorganismos se instala en los pisos y superficies horizontales. Deben descontaminarse rutinariamente los desagües de las piletas con un desinfectante o soluciones que contengan hipoclorito de sodio. Las superficies de trabajo en las que se manejan embriones deben limpiarse diariamente con alcohol etílico al 70%.
- **Equipos.** El laboratorio debe estar equipado con lo indispensable para realizar los procedimientos. La superficie externa de todos los equipos (especialmente las unidades de enfriamiento y los respiraderos en las unidades refrigeradas) se deben limpiar semanalmente. Los equipos pequeños (microscopios,

manipuladores, accesorios de video) deben protegerse con fundas de plástico y ser revisadas periódicamente para verificar su limpieza. Las lupas estereoscópicas deben limpiarse con alcohol etílico al 70% diariamente antes y después del uso. Las incubadoras de embriones requieren de especial atención, ya que los microorganismos prosperan en el calor y la humedad de las incubadoras, la correcta rutina de limpieza y posterior control evita problemas de contaminación. El lugar donde se colocan las incubadoras debe ser donde hay mínimo movimiento de aire y tráfico de personal. Otras fuentes de contaminación de la incubadora son los suministros de gas, agua y medio de cultivo. Además debe controlarse, la temperatura y los niveles de CO₂, que deberían ser monitoreados diariamente y calibrarse periódicamente. La frecuencia de desinfección de la incubadora depende de cada laboratorio, una incubadora no contaminada en funcionamiento debe ser desinfectada semestralmente utilizando procedimientos descritos en el manual del correspondiente equipo. La higiene de la incubadora puede mantenerse fácilmente cultivando los embriones en cámaras de incubadora que se colocan dentro de la incubadora común más grande pudiendo utilizarse varias simultáneamente, además permiten utilizar la concentración de gases adecuada para el cultivo. Varias consideraciones de control de calidad están asociadas al nitrógeno líquido, los tanques deben monitorearse rutinariamente y realizarse el llenado regular; la identificación de muestras y su ubicación dentro del tanque debe ser precisa, teniendo siempre un protocolo de registros apropiado; la prevención de la contaminación, ya que la puede ocurrir contaminación viral cruzada de tejidos contaminados con embriones que se almacenan juntos.

- **Personal.** La ropa, la piel y el cabello son potenciales contaminantes del laboratorio. Las personas que manejen embriones deben practicar una higiene personal aceptable. Se recomienda que se utilizan túnicas de laboratorio o ambos de cirugía. El calzado debe ser fácil de desinfectar o descartable.
- **Aseguramiento de calidad.** Control de calidad de embriones debe ser discutido rutinariamente en reuniones de personal, con especial énfasis en la capacitación técnica del personal nuevo. Todos los manuales de procedimientos técnicos y de seguridad deben mantenerse en el laboratorio, además de los registros de datos. Los manuales técnicos deben detallar los procedimientos paso a paso, citar referencias científicas apropiadas y ofrecer sugerencias a la resolución de problemas. Para prevenir los posibles problemas es necesario definir previamente rangos aceptables de resultados en términos de tasa de fertilización, tasa de desarrollo de blastocistos, tasa de preñez y analizar datos regularmente. Finalmente, llevar a cabo un registro detallado del monitoreo y mantenimiento de equipos, actividades realizadas, datos de materiales de detección (microorganismos) y certificados de análisis de productos debe mantenerse en el laboratorio o al alcance del personal.

6.1.2. Higiene del embrión

La PIVE requiere un entorno controlado, donde se utilicen reactivos adecuados, en un microambiente libre de microorganismos y sustancias tóxicas. Muchos medios de cultivo son efectivos para manipular y cultivar embriones en mamíferos en varias etapas de desarrollo, sin embargo, para mantener la viabilidad del embrión, se debe mantener la esterilidad y eliminar las impurezas del medio de cultivo. Todo el material de laboratorio descartable y reutilizable que entre en contacto con el embrión, el medio de cultivo y la atmósfera de cultivo debe ser estéril y libre de toxinas. Se han identificado agentes tóxicos asociados a materiales que comúnmente son utilizados en la recuperación de embriones y cultivo, además de materiales de la criopreservación.

- **Medio de cultivo.** El uso de guantes de látex en la preparación y manipulación del medio (y embriones) puede estar contraindicado debido a los posibles efectos tóxicos de polvo en los guantes. Si se utilizan guantes, deben enjuagarse primero con agua purificada o soluciones estériles. La higiene de las manos debe realizarse lavando con agua y jabón, y luego con alcohol etílico al 70%. En laboratorios de investigación, medios de cultivo se compran a proveedores comerciales o se preparan en el laboratorio que generalmente es más rentable, pero requiere una estricta práctica aséptica para evitar la contaminación. En general, los medios complejos deben usarse dentro de 2 semanas cuando se almacenan a 4°C, aunque algunos medios pueden almacenarse por más tiempo. Se cree que los cambios en el pH de los medios almacenados es responsable del deterioro de algunos nutrientes, aunque la exposición a luz ultravioleta y visible también puede ser perjudicial. Todos los medios completos para uso y los que estén abiertos deben mantenerse refrigerados a 4°C, solamente deben estar a temperatura ambiente las cantidades necesarias de uso inmediato. Muchas soluciones se pueden congelar, especialmente soluciones salinas básicas como el PBS. Así mismo debe tenerse en cuenta que algunos reactivos precipitan cuando están congelados. Los medios que se congelan y suplementos utilizados como el suero y factores de crecimiento deben almacenarse a -70°C o menos, esto evita una separación y concentración gradual de solutos en el fondo del recipiente, que puede conducir a la desnaturalización de proteínas e insolubilidad. Son necesarios los controles de rutina de la temperatura de los congeladores para detectar cualquier fluctuación en la temperatura, esta debe ser diaria. Se recomienda la utilización de agua purificada para la preparación de medios. No se recomienda el almacenamiento prolongado de agua purificada, ya que la pureza se deteriora con el tiempo, la lixiviación de algunos recipientes de almacenamiento de vidrio y plástico como el polietileno pueden contaminar con metales pesados y otros agentes potencialmente tóxicos. La adición de aminoácidos, albúmina y suero a los medios puede tener un efecto similar a los agentes quelatantes, mediante la unión no específica a metales pesados

contaminantes del medio. Se debe verificar el pH y la osmolaridad de todos los medios utilizados y soluciones crioprotectoras para confirmar que los niveles sean óptimos. La utilización de rojo fenol al medio proporciona una verificación visual de pH. Los medios deben ser esterilizados por filtración, utilizando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro en una cabina de bioseguridad. Se recomienda la evaluación de uno o varios lotes de un determinado componente antes de la compra. La utilización de suero fetal bovino u otros sueros pueden ser importantes fuentes de contaminación, por lo que se sugiere la utilización alternativa de otros suplementos como la albúmina sérica. A su vez debería realizarse un cultivo para verificar la ausencia de microorganismos cuando se utilizan sueros, estos deben inactivar por calor a 56°C durante 30 minutos y almacenarse en alícuotas a -70°C o menos.

- **Aceite.** La utilización de aceite de parafina, mineral o de silicona, debe ir acompañada de un lavado con una solución salina de NaCl al 0,9% estéril o medio de cultivo y luego pre-equilibrar en la incubadora, esto reduce el potencial de variabilidad del lote y cambios en el pH. Debido a las propiedades del aceite de mantenimiento y difusión lenta de calor, el sistema de cultivo cubierto en aceite protege de los cambios de temperatura y pH fuera de la incubadora. Además, el aceite absorbe las posibles toxinas presentes en el medio de cultivo.
- **Antibióticos.** Rutinariamente se agregan antibióticos a los medios de cultivo para controlar la contaminación fúngica y bacteriana. Estos deben ser fáciles de utilizar y compatibles con otros componentes del medio de cultivo. Idealmente, los antibióticos utilizados en los medios de colecta, cultivo, lavado, almacenamiento y la transferencia de embriones no deben ser tóxicos, deben suprimir la contaminación sin interferir con el crecimiento y metabolismo celular, previniendo la propagación de agentes patógenos, sin producir cambios en el pH o la osmolaridad de los medios. Los más utilizados para el control de bacterias con penicilina G (50 a 100 UI/ml), estreptomycin (50 a 100 $\mu\text{g/ml}$) y kanamicina (100 $\mu\text{g/ml}$); para el control fúngico se utilizan micostatina (50 U/ml) o anfotericina B (0.25 $\mu\text{g/ml}$).
- **Tratamiento con tripsina.** El tratamiento de la zona pelúcida con tripsina es un procedimiento sanitario obligatorio en la exportación de embriones que se utiliza para inactivar ciertos virus vinculados a la zona pelúcida. El método recomendado es un lavado combinado al tratamiento con tripsina. Los embriones son lavados 5 veces en PBS, conteniendo antibióticos y 0,4% de BSA, luego en 2 gotas que contienen tripsina al 0,25% (pH. 7,6-7,8) por un tiempo total en la tripsina de 60-90 segundos, después del tratamiento con tripsina los embriones se lavan 5 veces en PBS con antibióticos y 2% de suero con la finalidad de inactivar la tripsina.
- **Jeringas, catéteres, filtros y placas de cultivo.** Debe prestarse especial atención en los productos utilizados, ya que se ha demostrado que ciertas marcas y muchas de las jeringas descartables afectan negativamente a los embriones, probablemente debido a la lixiviación de benzotiazoles tóxicos del

émbolo de goma. Alternativamente, pueden utilizarse jeringas con émbolo plástico. Las placas de cultivo descartables que se utilicen también deben ser considerados cuidadosamente ya que pueden haber variaciones en el desarrollo. A su vez la utilización de pipetas para la manipulación de embriones deber ir acompañada de filtros.

- **Exposición a la luz.** Se ha demostrado que la luz ultravioleta de longitud de onda larga (320 a 400 nm) y la luz visible (400 a 750 nm) pueden causar daño cromosómico y mutagénesis a las células de cultivo de tejidos, sin embargo, poco se sabe acerca del efecto que pueda tener sobre la viabilidad del embrión. Pero lo cierto es que los factores promotores del crecimiento en el medio pueden deteriorarse después de una exposición prolongada a la luz blanca. Por lo tanto, se debe tener la precaución de minimizar la exposición a la luz tanto de los embriones como de los medios de cultivo.
- **Esterilización.** Se recomienda la utilización de placas de plástico, envases, jeringas, agujas y pipetas, estériles y descartables. Los materiales reutilizables deben lavarse con agua jabonosa antes de la esterilización y enjuagarse con agua desionizada (5 a 7 cambios) y agua destilada o purificada (3 a 5 cambios) para eliminar residuos de detergente u otras impurezas completamente. El método de esterilización apropiado depende de las propiedades del material.

El control de calidad en la PIVE es esencial para reducir la variabilidad asociada a los productos utilizados en el laboratorio y para garantizar procedimientos consistentes. Los resultados óptimos y la garantía efectiva de calidad depende de: la prevención, que requiere planificación y pruebas de rutina para garantizar que los suministros sean de calidad y que los equipos funcionen correctamente; el control interno, que evalúa la correcta ejecución de protocolos para garantizar la efectividad y la repetibilidad; y la corrección, que determina las causas de la deficiencia de la calidad y los procedimientos para recuperar los niveles de eficiencia esperados.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6):463-472.
2. Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P (2004). Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Animal Reproduction Science*, 81(1-2):77-86.
3. Bai J, Hou J, Guan H, Yan F, Cui X, Liu L, Wang X, An X (2008). Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during in vitro maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. *Theriogenology*, 70(5):758-764.
4. Baldassarre H, De Matos DG, Furnus CC, Castro TE, Fischer EC (1994). Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Animal Reproduction Science*, 35(1-2):145-150.
5. Baldassarre H, Karatzas CN (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, 82-83:255-266.
6. Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas C (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*, 57(1):275-284.
7. Bavister BD (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*, 1(2):91-148.
8. Berlinguer F, Gonzalez-Bulnes A, Contreras-Solis I, Spezzigu A, Torres-Rovira L, Succu S, Naitana S, Leoni GG (2012). Glucogenic supply increases oocyte developmental competence in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8):1055-1062.
9. Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, Çoyan K, Başpınar N, Cenariu MC, Bilgili A, Öztürk C, Kurşunlu AN (2013). Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology*, 67(1):34-39.
10. Catalá MG, Izquierdo D, Uzbekova S, Morato R, Roura M, Romaguera R, Papillier P, Paramio M (2011). Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, 142(4):517-527.

11. Chian RC, Okuda K., Niwa K (1995). Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, 38(1-2):37-48.
12. Cocero MJ, Alabart JL, Hammami S, Martí JI, Lahoz B, Sánchez P, Echegoyen E, Beckers JF, Folch J (2011). The efficiency of in vitro ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(3):463-470.
13. Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1):171-188.
14. Cognié Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P (2004). State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4):437-445.
15. Cognié Y, Poulin N, Pisselet C, Monniaux D (1995). Effect of atresia on the ability of follicular fluid to support developmental competence of sheep oocytes in vitro. *Theriogenology*, 1(43):188.
16. Cognie Y (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1):105-116.
17. Colas C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muiño-Blanco T (2008). Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(6):649-658.
18. Cox JF, Alfaro V (2007). In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(1):83-87
19. Cran DG, Moor RM, Hay MF (1980). Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *Reproduction*, 59(1):125-132.
20. Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Menchaca A (2015a). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PloS one*, 10(8): e0136690.
21. Crispo M, Vilarino M, dos Santos-Neto PC, Nunez-Olivera R, Cuadro F, Barrera N, Menchaca A (2015b). Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Research*, 24(1):31-41.

22. Crozet N, Huneau DBNB, Desmedt V, Théron MC, Szöllösi D, Torrès S, Sévellec C (1987). In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Research*, 16(2):159-170.
23. Cuadro F (2018). Alta concentración de progesterona durante el desarrollo folicular mejora la competencia ovocitaria y la producción de embriones en ovinos. Tesis de maestría en reproducción animal. Facultad de Veterinaria, UdelaR 49 p.
24. Czlonkowska M, Eysymont U, Guskiewicz A, Kossakowski M, DZIAK J (1991). Birth of lambs after In vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Molecular Reproduction and Development*, 30(1):34-38.
25. Dautier L, Thibault C, Wintenberger S (1953). Variations des réponses de l'ovarie de la brebis a des doses croissantes d'hormones gonadotropes d'origines diverses. *Sciences*, 2(2):189-195.
26. de Matos DG, Gasparini B, Pasqualini SR, Thompson JG (2002). Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, 57(5):1443-1451.
27. de Souza JMG, Duffard N, Bertoldo MJ, Locatelli Y, Corbin E, Fatet A, de Figueiredo Freitas VJ, Mermillod P (2013). Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. *Animal Reproduction Science*, 138(1-2):82-89.
28. de Souza-Fabjan JMG, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, de Figueiredo JR, de Figueirêdo Freitas VJ, Mermillod P (2014). In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*, 81(9):1149-1162.
29. Del Olmo E, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, Jiménez-Rabadán P, Iniesta-Cuerda M, Anel-Lopez L, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MR (2016). Estrous sheep serum enables in vitro capacitation of ram spermatozoa while preventing caspase activation. *Theriogenology*, 85(2):351-360.
30. DIEA (2019). Anuario Estadístico Agropecuario 2019, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf> Fecha de consulta: 27 de noviembre de 2019.
31. Fry RC, Niall EM, Simpson TL, Squires TJ, Reynolds J (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, 47(5):977-987.

32. Gandolfi F, Moor RM (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(1):23-28.
33. Garcia-Garcia RM, Ward F, Fair S, O'meara CM, Wade M, Duffy P, Lonergan P (2007). Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Animal Reproduction Science*, 98(3-4):233-240.
34. Gardner DK, Lane M (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*, 13(3):148-159.
35. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction*, 50(2):390-400.
36. Gibbons A, Bonnet FP, Cueto MI, Catala M, Salamone DF, Gonzalez-Bulnes A (2007). Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4):423-426.
37. Gordon I (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. 2^a ed. Wallingford. CABI, 548 p.
38. Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y (2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, 54(2):209-218.
39. Fischer B, Bavister BD (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Reproduction*, 99(2):673-679.
40. Heidari B, Shirazi A, Naderi MM, Akhondi MM, Hassanpour H, Sarvari A, Borjian S (2013). Effect of various co-culture systems on embryo development in ovine. *CzechJournal of Animal Science*, 58(10):443-452.
41. Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-Gonzalez I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9):5623-5633.
42. Huneau D, Crozet N, Ahmed-Ali M (1994). Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. *Theriogenology*, 42(6):1017-1028.

43. Keskinetepe L, Darwish, GM, Kenimer AT, Brackett BG (1994). Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology*, 42(3):527-535.
44. Kochhar HPS, Buckrell BC, Pollard JW, King WA (1999). Cleavage, sex and cell number of ovine embryos developed after different sperm-oocyte co-incubation intervals. *Theriogenology*, 51(1):322.
45. Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11):7977-7985.
46. Krisher RL, Wheeler MB (2010). Towards the use of microfluidics for individual embryo culture. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1): 32-39.
47. Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD (1988). Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Research*, 20(2):185-201.
48. Leibfried L, First NL (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, 48(1):76-86.
49. Leoni GG, Rosati I, Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S (2007). A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(3):299-304.
50. Lee CN y Ax RL (1984). Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *Journal of Dairy Science*, 67(9):2006-2009.
51. Li F, Pi WH, Zhu HZ, Zhang SS, Liu SR, Xue JL (2006). The effect of estrous ewe serum and heparin on in vitro fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Ruminant Research*, 63(3):226-232.
52. Loi P, Matzukawa K, Ptak G, Natan Y, Fulka JJr, Arav A (2008). Nuclear Transfer of Freeze-Dried Somatic Cells into Enucleated Sheep Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2):417-422.
53. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4):259-267.
54. Mara L, Sanna D, Casu S, Dattena M, Muñoz IMM (2013). Blastocyst rate of in vitro embryo production in sheep is affected by season. *Zygote*, 22(3):366-371.

55. Matoba S, Fair T, Lonergan P (2010). Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(5):839-851.
56. Menchaca A, Anegon I, Whitelaw CB, Baldassarre H, Crispo M (2016a). New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology*, 86(1):160-169.
57. Menchaca A, Barrera N, dos Santos Neto PC, Cuadro F, Crispo M (2016b). Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats. *Animal Reproduction*, 13(3):273-278.
58. Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, de Castro T, Rubianes E (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1):113-118.
59. Menchaca A, Vilariño M, dos Santos Neto PC, Wijma R, Crispo M (2012). Cumulus cells are involved in oocyte maturation and fertilization in vitro ovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 47(4) (abstract).
60. Menchaca A, Vilariño M, Dos Santos-Neto PC, Wijma R, Pinczak A, de Castro T, Crispo M (2012). Producción de los primeros corderos por fertilización in vitro en Uruguay. 4º Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal, Montevideo, Uruguay, p178.
61. Mermillod P, Dalbiès-Tran R, Uzbekova S, Thélie A, Traverso J, Perreau C, Papillier P, Monget P (2008). Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle?. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2):393-400.
62. Morton KM, de Graaf SP, Campbell A, Tomkins LM, Maxwell WM, Evans G (2005). Repeat ovum pick-up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(5):422-428.
63. Morton KM, Maxwell WMC, Evans G (2008). Effect of Aspiration Pressure during Oocyte Harvesting on Oocyte Recovery and in vitro Development of Ovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(1):106-110.
64. Natarajan R, Bhawani SM, Munuswamy D (2010a). Effect of L-ascorbic acid supplementation at different gaseous environments on in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *Animal Reproduction*, 7(1):21-28.
65. Natarajan R, Shankar MB, Munuswamy D (2010b). Effect of α -tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro

- development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(8):483-490.
66. O'Brien JK, Catt SL, Ireland KA, Maxwell WMC, Evans G (1997). In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*, 47(7):1433-1443.
 67. Olivares C, da Fonseca JF, Saraiva H, Alfradique V, Côrtes L, Costa L, Souza-Fabjan JM (2016). Influence of Mini-Percoll techniques on motility parameters of ram frozen-thawed sperm. *International Congress of Animal Reproduction*. Tours, Francia, p. 168-169 (abstract)
 68. Olivares CCS, de Souza-Fabjan JMG, da Fonseca JF, Balaro MFA, de Figueirêdo Freitas VJ, de Oliveira RV, Brandão FZ (2017). Comparison of different sperm selection techniques in ram frozen-thawed sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45:1-10.
 69. OPYPA (2018). Anuario OPYPA 2018, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuario%202018/ANUARIO%20OPYPA%202018%20WEB%20con%20v%C3%ADnculo.pdf> Fecha de consulta: 27 de noviembre de 2019.
 70. Paramio MT (2010). In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, 89(2-3):144-148.
 71. Paramio MT, Izquierdo D (2014). Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4):37-48.
 72. Paramio MT, Izquierdo D (2016). Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86(1):152-159.
 73. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 303(5658):682-684.
 74. Parrish JJ (2014). Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1):67-73.
 75. Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44(6):859-869.
 76. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4):591-600.

77. Pawshe CH, Totey, SM, Jain SK (1994). A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, 42(1):117-125.
78. Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M, Cappai P (1999). Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*, 52(6):1105-1114.
79. Pugh PA, Fukui Y, Tervit HR, Thompson JG (1991). Developmental ability of *in vitro* matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized *in vitro* with frozen ram semen. *Theriogenology*, 36(5):771-778.
80. Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ, (1992). Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95(2):585-595
81. Rizos D, Ward F, Duffy PAT, Boland MP, Lonergan P (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2):234-248.
82. Rodriguez C, Anel L, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Chamorro CA, De Paz P (2006). Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(2):106-113.
83. Salhab M, Papillier P, Perreau C, Guyader-Joly C, Dupont J, Mermillod P, Uzbekova S (2010). Thymosins β -4 and β -10 are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(8):1206-1221.
84. Shabankareh HK, Akhondi M (2012a). Effect of glucose levels and MEM vitamins during the first step of IVC in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of ovine zygotes. *Small Ruminant Research*, 106(1):54-58.
85. Shabankareh HK, Kafilzadeh F, Soltani L (2012b). Treatment of ovine oocytes with certain water-soluble vitamins during in vitro maturation (IVM). *Small Ruminant Research*, 104(1-3):139-145.
86. Shabankareh HK, Sarsaifi K, Mehrannia T (2011). In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(6): 531-537.

87. Shabankareh HK, Zandi M (2010). Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Fertility and Sterility*, 94(1):335-340.
88. Sirard MA, Blondin P (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, 42(1):417-426.
89. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1):126-136.
90. Shirazi A, Motaghi E (2013). The in vitro fertilization of ovine oocytes in the presence of oviductal cells and its effect on the expression of zygote arrest 1 (zar1) and subsequent embryonic development. *Journal of Reproduction & Infertility*, 14(1):8-16.
91. Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Ahmadi E, Heidari B (2010). Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(3):530-536.
92. Slavik T, Fulka J, Goll I (1992). Pregnancy rate after the transfer of sheep embryos originated from randomly chosen oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 38(4):749-756.
93. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, 64(3):904-909.
94. Stringfellow DA, Seidel SM (1998). *Manual of the international embryo transfer society*. 3rd ed. Savoy, International Embryo Transfer Society, 171 p.
95. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA (1972). Successful culture of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30(3):493-497.
96. Tervit HR, Smith JF, McGowan LT, Wells RW, Parr J (1992). Laparoscopic recovery of oocytes from sheep. *Proceedings of the Australian Society for Reproductive Biology*, 24:26.
97. Thibault C, Szöllösi D, Gérard M (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Développement*, 27(5):865-896.
98. Thompson JG (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos—a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, 60-61:263-275.

99. Thompson JGE, Cummins JM (1985). The effects of washing and protein supplementation on the acrosome reaction of ram spermatozoa in vitro. *Animal Reproduction Science*, 9(1):75-86.
100. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ (1996). Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of reproduction and fertility*, 106(2):299-306.
101. Udy GB, McGowan LT, Nemaia FA, Ankersmit AEL, Tervit HR (1994). Cattle oocyte recovery is affected more by aspiration pressure than needle size. *Proceedings of the Australian Society for Reproductive Biology* 26:17 (abstract).
102. Vajta G, Korösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy ZP (2008). The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(1):73-81.
103. Vanroose G, Van Soom A, de Kruif A (2001). From Co-culture to Defined Medium: State of the Art and Practical Considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(1):25-28.
104. Vilariño M, Crispo M, dos Santos-Neto PC, Wijma R, Menchaca A (2012). The effect of culture medium changes on in vitro production of sheep embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 47:512-512 (abstract).
105. Visconti PE, Krapf D, De La Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, 13(3):395-405.
106. Walker SK, Hartwich KM, Robinson JS, Seamark RF (1998). Influence of in vitro culture of embryos on the normality of development. *Proceedings Serona Symposia*. Roma, Italia, pp. 457-484(abstract).
107. Wan PC, Hao ZD, Zhou P, Wu Y, Yang L, Cui MS, Liu SR, Zeng SM (2009). Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine in vitro fertilization embryos. *Animal Reproduction Science*, 114(1-3):279-288.
108. Wani AR, Khan MZ, Sofi KA, Lone FA, Malik AA, Bhat FA (2012). Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research*, 106(2-3):160-164.
109. Wani NA, Wani JM, Khan MZ, Sidiqi MA (1999). Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. *Small Ruminant Research*, 34(1):71-76.

110. Wang Z, Lin P, Yu S (2013). Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos. *Theriogenology*, 79(4):695-701.
111. Wang ZB, Schatten H, Sun QY (2011). Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging?. *Physiology*, 26(5):314-325.
112. Ward FA, Enright BP, Boland MP (2000). Effect of group size and oocyte to medium volumen post-fertilization on the development of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 53(1):306.
113. Watson AJ, Watson PH, Warnes D, Walker SK, Armstrong DT, Seamark RF (1994). Preimplantation Development of In Vitro-Matured and In Vitro-Fertilized Ovine Zygotes: Comparison between Coculture on Oviduct Epithelial Cell Monolayers and Culture under Low Oxygen Atmosphere. *Biology of Reproduction*, 50(4):715-724.

8. ANEXO

LISTA DE MATERIALES Y REACTIVOS ESPECIFICOS

Producto	Marca/proveedor	Código de producto
Agua embryo tested ⁽¹⁾	Sigma Aldrich	W1503
BME Amino Acids Solution ⁽²⁾	Sigma Aldrich	B6766
BSA ⁽³⁾	Sigma Aldrich	A3311
Calcium chloride dihydrate $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ⁽⁴⁾	Sigma Aldrich	C7902
Capilares microhematocrito sin heparina ⁽⁵⁾	Droguería Industrial Uruguay	SUP-67828
Cysteamine ⁽⁶⁾	Sigma Aldrich	M9768
FSH Foltropin V ⁽⁷⁾	Vetoquinol	Syntex
Heparin sodium salt (10KU) ⁽⁸⁾	Sigma Aldrich	H3149
HEPES ⁽⁹⁾	Sigma Aldrich	H3375
Hypotaurine (10 mg) ⁽¹⁰⁾	Sigma Aldrich	H1384
Luteinizing Hormone from sheep pituitary ⁽¹¹⁾	Sigma Aldrich	L5269
Magnesium sulfate heptahydrate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ⁽¹²⁾	Sigma Aldrich	M1880
Medium 199 with Earle's salts and L-glutamune ⁽¹³⁾	Tanirel/Capricorn	M199-A
MEM Non-essential Amino Acids Solution ⁽¹⁴⁾	Sigma Aldrich	M7145
Mineral oil ⁽¹⁵⁾	Sigma Aldrich	M8410
Penicilin G potassium salt ⁽¹⁶⁾	Sigma Aldrich	P7794
Penicilina G ⁽¹⁷⁾	Laboratorio Ion	301
Penicillin-Streptomycin ⁽¹⁸⁾	GIBCO/INVITROGEN	AL-15140122
Phenol red solution ⁽¹⁹⁾	Sigma Aldrich	P0290
Potassium chloride KCl ⁽²⁰⁾	Sigma Aldrich	P5405
Potassium phosphate monobasic	Sigma Aldrich	P5655

$\text{KH}_2\text{PO}_4^{(21)}$		
SFB-Fetal Bovine Serum ⁽²²⁾	GIBCO/INVITROGEN	16000-044
Sodium bicarbonate $\text{NaHCO}_3^{(23)}$	Sigma Aldrich	S5761
Sodium chloride $\text{NaCl}^{(24)}$	Sigma Aldrich	S5886
Sodium DL-lactate solution $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3^{(25)}$	Sigma Aldrich	L7900
Sodium phosphate dibasic solution ⁽²⁶⁾ Na_2HPO_4	Sigma Aldrich	S7907
Sodium pyruvate $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3^{(27)}$	Sigma Aldrich	P4562
Suero Fisiológico ⁽²⁸⁾	Droguería Industrial	84612
Trigas N_2 90%, CO_2 5% y O_2 5% ⁽²⁹⁾	Linde Gas AGA S.A	-