

INFORME FINAL DE PASANTÍA PROFESIONAL EN LA UNIVERSIDAD
DE SAN PAULO

Presentado al programa de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias
Agrarias de la Universidad de Pamplona como requisito para optar al título de
Médico Veterinario

Por John Camilo Murillo Sánchez

® Derechos Reservados, 2016

INFORME FINAL DE PASANTÍA PROFESIONAL EN LA UNIVERSIDAD
DE SAN PAULO

Presentado al programa de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias
Agrarias de la Universidad de Pamplona como requisito para optar al título de
Médico Veterinario

Tutor: MVZ, ESP. Luis Ernesto Quintero Rodríguez

Por John Camilo Murillo Sánchez

® Derechos Reservados, 2016

Resumen

La producción *in vitro* de embriones (PIVe) bovinos se debe ver como una alternativa para ser introducida en los programas de reproducción, ya que además de su importancia para estudios biotecnológicos posee fundamento comercial. La PIV esta siendo usada comercialmente por algunas empresas, con buenos resultados. El principal objetivo de la PIV comercial se basa en la obtención de embriones viables de hembras que no están aptas para producir descendientes por técnicas convencionales, como en vacas donadoras que presentan infertilidad probada por tratamientos con gonadotropinas o por disfunciones patológicas del aparato reproductor femenino. Hembras a partir de los seis meses de edad, gestantes hasta el tercer mes y vacas pos parto (2 a 3 semanas) pueden ser utilizadas como donadoras para la producción *in vitro* de embriones. Otra ventaja de las aspiración folicular guiada por ultrasonografía en la PIV es el hecho de que no es necesario el uso de hormonas para la obtención de los ovocitos. A pesar de estas ventajas, estudios relacionados con la maduración ovocitaria, fecundación ovocitaria y cultivo de embriones son todavía necesarios apuntando a la mejora de la técnica junto con la producción de embriones de buena calidad. El objetivo de este trabajo es describir la técnica y las principales etapas de la producción *in vitro* de embriones, actividades efectuadas en el marco de la pasantía profesional realizada en la Universidad de San Paulo.

Palabras clave: embriones, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*, ultrasonografía.

Abstract

The Bovine embryo in vitro production must be seen as one more alternative to be introduced in the assisted reproduction programs. It has importance to biotechnologies studies and it has been used commercially. The production of embryos in vitro (PIV), has been used commercially for some companies with good results. The primary purpose of PIV commercial seeks to obtain viable embryos of bovine females who are no longer able to produce offspring by conventional techniques, such as donor cows showing infertility caused by treatment with gonadotrophin or by pathological disorders of the reproductive female. Females from six months of age, pregnant women up to the third month, and even post- partum (2 to 3 weeks) can be used as donors for the PIV. Another advantage of follicular aspiration guided by ultrasound in PIV is in the fact that it is not necessary the use of hormones for the recovery of oocytes. Despite these advantages, studies related to the maturation oocitária, oocyte fertilization and embryo culture are still seeking the necessary technical and maximising the production of embryos of good quality. The goal desse work is to describe the technique and the main steps of the production of embryos in vitro cattle, activities which were applied in the professional practicum carried out at the University of Sao Paulo.

Keywords: embryos, in vitro maturation, in vitro fertilization, ultrasonography.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. UNIVERSIDAD DE SAN PAULO.....	12
3.1. Departamento de reproducción animal.....	13
3.1.1. Laboratorio de biotecnología de semen y andrología (LBSA).....	15
3.1.2. Laboratorio de fisiología y endocrinología molecular (LFEM).....	15
3.1.3. Laboratorios de fecundación in vitro, clonación y transgéncia animal.....	16
4. DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL (VRA), UNIVERSIDAD DE SAN PAULO, BRASIL.....	18
4.1. Descripción y análisis de las actividades desarrolladas.....	18
5. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN <i>VITRO</i>.....	19
5.1. Transporte de los ovarios.....	20
5.2. Lavado ovarios y aspiración de los folículos.....	20
5.3. Aspiración folicular (<i>Ovum Pick Up</i>).....	21
5.4. Preparación de equipos.....	22
5.5. Preparación de medios.....	23
5.6. Maduración de ovocitos.....	25
5.6.1. Fisiología de la maduración.....	25
5.6.2. Metabolismo del complejo cumulus ovocito durante el proceso de maduración.....	29
5.6.3. Procedimiento <i>in vitro</i>	30
5.7. Capacitación espermática.....	32
5.7.1. Procedimiento percoll.....	34
5.8. Fertilización <i>in vitro</i>.....	35
5.8.1. Procedimiento.....	36
5.9. Cultivo de embriones.....	39
6. CURSOS TEÓRICO PRÁCTICOS.....	41
7. CONCLUSIONES.....	43

8. INTRODUCCIÓN.....	45
9. HIPÓTESIS.....	46
10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	47
11. JUSTIFICACIÓN.....	48
12. OBJETIVO.....	50
12.1. Objetivo general.....	50
12.2. Objetivos específicos.....	50
13. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍA.....	51
13.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos.....	51
13.2. Aspiración folicular de ovarios de matadero.....	51
13.3. Aspiración folicular guiada por ultrasonografía.....	52
13.4. Maduración <i>in vitro</i>	53
13.5. Fertilización <i>in vitro</i>	53
13.6. Separación de semen.....	54
13.8. Análisis convencional del semen.....	56
13.9. Análisis computarizado del movimiento espermático.....	56
13.9.1. Análisis computarizado del movimiento espermático.....	57
13.10. Análisis espermático por citometría de flujo.....	57
13.11. Análisis espermáticos por citometría de flujo.....	58
13.11.1. Evaluación de las membranas plasmática y acrosomal.....	58
13.11.2. Evaluación de la estabilidad de la membrana plasmática.....	60
14. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
14.1. Diseño experimental.....	62
14.2. Reactivos y soluciones.....	62
15. PROCEDIMIENTO.....	63
15.1. Obtención de material biológico.....	63
15.2. Análisis espermáticos.....	63
15.2.1. Motilidad espermática visual.....	63
15.2.2. Concentración espermática visual.....	64
15.3. Parámetros espermáticos.....	65

15.4. Citometría de flujo.....	66
15.4.1. Potencial de membrana mitocondrial.....	66
15.4.2. Evaluación de la estructura de la cromatina.....	67
15.4.3. Evaluación de la membrana plasmática y acrosomal.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	79

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ovarios provenientes del frigorífico en solución salina al 0,9%.....	20
Figura 2: A, equipamiento para aspiración folicular (baño maría, aguja calibre 21 corta, solución salina 0,9%). B, tubo cónico 15 ml aspiración del sedimento (ovocitos).....	21
Figura 3: Equipamiento para aspiración folicular.....	22
Figura 4: Equipos para procesos de MIV FIV CIV.....	23
Figura 5: Preparación de medios para maduración in vitro de ovocitos.....	25
Figura 6: Ovocitos seleccionados para maduración in vitro, nótese las células del cumulus compactas.....	26
Figura 7: Ovocitos con 24 horas de maduración aptos para fecundación.....	28
Figura 8: Procesos bioquímicos de la maduración ovocitaria.....	30
Figura 9: Fecundación in vitro.....	36
Figura 10: Disposición de gotas color naranja medio Pre FIV, color transparente medio KSOM, para lavar los posibles cigotos ya fecundados.....	39
Figura 11: Embriones en diferentes estadios de desarrollo.....	40
Figura 12: Embriones en estadio de blastocitos (inicial, blastocito, expandido).....	41
Figura 13: Evaluación de motilidad espermática en microscopia invertida.....	64
Figura 14: Cámara de Neubauer para evaluar concentración espermática.....	65
Figura 15: Evaluación de diferentes tratamientos percoll por citometría de flujo....	66

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Medio base para maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	31
Tabla 2: Medio para lavado MIV (Pre MIV).....	31
Tabla 3: Medio de Maduración <i>in vitro</i>	32
Tabla 4: Medio de lavado FIV (Pre FIV).....	37
Tabla 5: Medio FIV	37
Tabla 6: Medio FIV gota.....	38
Tabla 7: Medio de cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	41

1. INTRODUCCIÓN

La Medicina Veterinaria viene implementando grandes avances en sus diferentes campos de acción; el desarrollo de importantes biotecnologías en áreas como la reproducción animal generan beneficios relevantes para la ganadería mundial. Tecnologías como la inseminación artificial a tiempo fijo, producción de embriones *in vivo e in vitro*, vitrificación de embriones, micro manipulación de embriones y transgéncia animal, son biotécnicas que vienen ganando relevancia en el ámbito pecuario. Colombia ha intensificado el uso de la transferencia de embriones en los últimos 10 años, con cifras que duplican la cantidad de transferencias realizadas en la década de los años 90, situación que refleja la tendencia de la transferencia de embriones (TE) en el mundo según, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2013). En la panorámica global el número de embriones producidos por *Ovum Pick Up* / producción de embriones *in vitro* (OPU/PIV) en América del sur correspondió al 72% de la producción mundial, siendo Brasil el mayor productor mundial con 366. 517 embriones producidos, cerca del 70% del total mundial sociedad internacional de tecnología de embriones (IETS, 2014). Cifras tan altas en la producción de embriones en Brasil se deben en gran parte a la cantidad de bovinos 217 millones organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO,2014), y a las particularidades de la ganadería nacional que básicamente son razas cebuinas, las cuales presentan mayor producción de ovocitos en cada colecta (vacas Nelores presentan una media aproximada de 30 ovocitos por sección de *Ovum Pick Up* (OPU), y pueden llegar hasta 128 ovocitos viables colectados en un solo animal (Pontes, et al., 2011).

Grandes progresos se han alcanzado en el conocimiento científico del Brasil en cuanto a las biotecnologías de la reproducción tanto animal como humana, convirtiéndose así en referente mundial a la par de países como Canadá y Estados Unidos.

A continuación se hará una descripción de las actividades de pasantía profesional realizadas durante la estadía en la Universidad de San Paulo, así mismo se hace una revisión bibliográfica de la producción *in vitro* de embriones.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Adquirir fundamentos prácticos y teóricos en cuanto a las diferentes técnicas de la producción de embriones *in vitro* en el Laboratorio de Fertilización *in vitro*, Transgénica y Clonación animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad de San Paulo, mediante la intervención en los diferentes procesos biotecnológicos desarrollados durante la práctica profesional.

2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Participar de forma activa en las actividades de investigación en el departamento de reproducción animal de la Universidad de San Paulo.
- ✓ Adquirir bases fundamentales para la producción de embriones *in vitro* en bovinos.
- ✓ Conseguir destrezas en las técnicas usadas en los laboratorios de fecundación *in vitro*, clonación y transgénica animal.

3. UNIVERSIDAD DE SAN PAULO

Creada en 1938, la Universidad de Sao Paulo (USP) es una de las más importantes instituciones de nivel superior en Brasil, el talento y dedicación de los docentes, estudiantes y funcionarios han sido reconocidos por diferentes rankings mundiales, creados para medir la calidad de distintas universidades a partir de diversos criterios, principalmente los relacionados con la productividad científica.

La USP esta en el puesto numero 29 según webometrics ranking of world universities 2014, que tiene como consideración los contenidos disponibles en la internet, especialmente aquellos relacionados a los procesos de generación y comunicación académica y de conocimiento científico.

La Universidad esta en 1º lugar también en el ranking webometrics que evalúa las Universidades de América Latina y en el también clasifican los países de Rusia, India, China y África del sur.

En el SIR world report 2013, elaborado por la scimago Lab, la Universidad Sao Paulo es considerada la universidad del Brasil con más artículos científicos publicados, ingresados en la base de datos Scopus entre los años 2007 y 2011, entre las instituciones de educación superior de todo el mundo, la USP es la institución brasilera mejor posicionada, estando en 5º lugar en el ranking mundial con 48.156 trabajos publicados entre 2007 y 2011.

Este desempeño, generado a lo largo de 80 años de una intensa búsqueda por la excelencia, permite a la USP integrar un selecto grupo de instituciones de estatus mundial. Su graduación es formada por 249 cursos, dedicados a todas la áreas del conocimiento, distribuidos en 42 unidades de enseñanza e investigación, con mas de 58 mil estudiantes. La pos graduación

esta compuesta por 239 programas, de los cuales hacen parte 332 cursos de maestría y 309 de doctorado los cuales tiene mas de 28 mil matriculados.

Actualmente la USP es responsable por el 22% de la producción científica del país.

Para el desarrollo de sus actividades las USP cuenta con diversos campos, distribuidos por las ciudades de São Paulo, Bauru, Lorena, Piracicaba, Pirassununga, Ribeirão Preto, Santos, São Carlos, además de Unidades en enseñanza, museos y centros de investigación situados fuera de estos espacios en diferentes partes de Brasil.

Adicionalmente, su servicio de extensión a la comunidad envuelve la atención anual a cerca de 60 mil animales y 70 mil exámenes de laboratorio para auxilio en el diagnostico veterinario.

Esta constituida por seis departamentos: cirugía, clínica medica, medicina veterinaria preventiva y salud animal, reproducción animal, patología-nutrición y producción animal. Cuenta con el museo de anatomía animal, biblioteca especializada, hospital veterinario para animales pequeños, hospital para aves y hospital para grandes animales junto con exámenes de laboratorio. La anterior descripción modificada, pertenece a la Universidad de San Paulo, 2016.

3.1. Departamento de reproducción animal

Después de la tramitación por los órganos superiores, el departamento de Reproducción animal (VRA) fue reconocido por el consejo universitario el 20/12/1988 y oficializado por el rector de ese entonces a través de la ordenanza 3476, de 27/12/1988, separándose del antiguo departamento de

cirugía y obstetricia (VCO) que a su vez paso a llamarse departamento de cirugía (CVI).

La gran mayoría de los equipos así como el material de uso especializado en la enseñanza y en la investigación fue adquirido a través de proyectos dirigidos a entidades financieras.

El 14 de septiembre del año 1990 fue abierto el centro de inseminación artificial y creado el centro de biotecnología en reproducción animal, en el campo de Pirassununga por el vice-rector de la Universidad de San Paulo

El centro está localizado en un área aproximada de 210.000 m², con área construida inicial de 1.000 m², duplicada para 2.000 m², donde están los laboratorios de fisiología y endocrinología molecular, biotecnología de semen y andrología, biotecnología de ovinos y caprinos, sala para colecta de semen y embriones, corral abierto para manejo en bretes (8 bretes,) 4 salas de docentes y sala para aulas teóricas, 18 potreros (12.000 m²), y 20.000 m² para almacenamiento de heno, entre otros predios.

Dos edificaciones de 250 m² cerca al centro, sirve de alojamiento para docentes, pos graduandos, estudiantes de último semestre y monitores.

Los laboratorios que componen el departamento de reproducción animal (VRA) son:

- Laboratorio de dosificación hormonal.
- Laboratorio de biotecnología del semen y andrología.
- Laboratorio de fisiología y endocrinología molecular.
- Laboratorio de fecundación *in vitro*, clonación y transgénica animal.
- Laboratorio de andrología y tecnología de embriones.

3.1.1. Laboratorio de biotecnología del semen y andrología (LBSA)

En funcionamiento desde 1987, sub coordinador Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, el laboratorio de biotecnología del semen y andrología- LBSA atiende a los estudiantes de graduación, a través de clases prácticas, a los estudiantes de pos graduación por medio de colaboración en las pesquisas y a través de la infraestructura. Se realiza también un trabajo de extensión en el campus administrativo de Pirassununga, para propiedades públicas y privadas de la región, inclusive empresas específicas del sector en reproducción animal.

Debido a su infraestructura y sus equipamientos de última tecnología, actualmente el LBSA puede ser considerado el laboratorio más completo de andrología animal del Brasil, realizando análisis de semen de animales de producción (bovinos, ovinos, caprinos, suinos, equinos y aves), enfriamiento y criopreservación de semen, fisiología de la reproducción de hembras equinas, inseminación artificial en equinos, transferencias y criopreservación de embriones equinos.

3.1.2. Laboratorio de fisiología y endocrinología molecular (LFEM)

La misión del LFEM es “aumentar el conocimiento sobre la biología de la reproducción animal a través del entrenamiento de cursos en humanos diferenciados y realización de investigaciones de excelencia.

El LFEM actúa en el desenvolvimiento de los mecanismos celulares y moleculares que controlan los procesos reproductivos en hembras de las especies domésticas. Específicamente, son objetivos del LFEM investigar los efectos de los esteroides sexuales en el proceso de la luteolisis y del mantenimiento de la preñez en bovinos, estudiar la composición proteica del ambiente uterino en bovinos y su relación con la fertilidad, elaborar modelos *in vitro* para el estudio de la liberación de prostaglandina F2 alfa ($PF_2 \alpha$). Elaborar y testar estrategias antiluteolíticas para aumentar las tasas de concepción en rebaños bovinos. El profesor a cargo de dicho laboratorio es el Dr. Mário Binelli.

3.1.3. Laboratorios de fecundación *in vitro*, clonación y transgénia animal

El laboratorio inició sus actividades en 1989, año en el cual el Prof. Visintin retornó del pos doctorado en Alemania, implementando novedades en el área de transferencia y criopreservación de embriones en las diferentes especies.

En 1994, tuvo inicio la fecundación *in vitro* en bovinos, herramienta base para los estudios actuales en clonación y transgénia animal, siendo uno de los tres laboratorios pioneros en esta biotécnica en el Brasil. En el año de 1999, inició los proyectos de fecundación *in vitro* en la especie suina, modelo fundamental para los estudios de transgénia y de xenotransplante. En 2001, se inició el estudio de maduración ovocitaria en caninos.

En San Paulo el laboratorio cuenta con 8 salas (3 de biología molecular, 1 de fecundación *in vitro* en bovinos, 1 de fecundación *in vitro* en suinos, 1 de

cultivo celular, 1 de preparo de medios y 1 multifuncional. Estos laboratorios tienen la finalidad de estudiar las bases fisiológicas y moleculares de la maduración ovocitaria, de la fecundación, del cultivo embrionario, del ciclo celular y de la capacitación espermática.

Desenvuelve y perfecciona biotecnologías de la reproducción, como la clonación y la transgénesis animal, buscando producir animales transgénicos que puedan servir de modelo de estudio en áreas básicas y aplicadas. En Pirassununga, el laboratorio posee un anexo en el CBRA, constituido del Laboratorio de Embriones y Corral Didáctico. Estas instalaciones son constantemente utilizadas para el aprendizaje en graduación y pos graduación, también para cursos de extensión.

Las técnicas aplicadas en el laboratorio son:

- Valoración de DNA de espermatozoides y embriones.
- Expresión génica en ovocitos y embriones.
- Colecta y transferencia de embriones de ratones bovinos.
- Análisis de viabilidad de embriones y espermatozoides por sondas fluorescentes.
- Clonación y transgénesis animal.
- Construcción de vectores para transgénesis.
- Cultura de células.

Los siguientes son innovaciones de relevancia se efectuaron en este laboratorio:

- Cris - 1º raton transgénico del Brasil.
- Marcolino de la USP - 1º clon brasileiro oriundo de célula somática de feto bovino.

- Bela USP - 2º clon de la raza nelore producido en el Brasil oriundo de célula somática de individuo adulto.

Responsable y directora del departamento de reproducción animal Profa. Dra.

Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção

Los datos anteriores fueron descritos con base a lo presentado por la pagina oficial de la Universidad de San Paulo. <http://www.fmvz.usp.br>.

4. DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL (VRA), UNIVERSIDAD DE SAN PAULO, BRASIL

4.1. Descripción y análisis de las actividades desarrolladas:

Una extensa gama de actividades se desarrollan en este importante centro de estudios, el departamento abarca un gran número de especies de interés reproductivo; con el propósito de dirigir mis actividades en una de tantas especies, opté por enfocar mis prácticas más hacia los bovinos sin dejar a un lado nuevas tecnologías que vienen siendo aplicadas en otras especies y que pueden ser extrapoladas hacia grandes rumiantes.

Bajo la dirección de la Profesora Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpcao jefe del departamento. Inicé labores el día 4 de enero de 2016 en los laboratorios de fecundación *in vitro*, clonación y transgéncia animal.

Participando también en prácticas y cursos de interés propio en las diferentes instalaciones del VRA vinculándome así con los diferentes laboratorios dentro del departamento.

Orientado por un grupo de selectos investigadores, entre los que destacan: doctora Camilla Mota Mendez, con pos doctora en el área de

reproducción animal; Thais Rose dos Santos Hamilton, pos doctoranda en el área de reproducción animal; Leticia Signori de Castro, doctoranda en el área de reproducción animal; Luana de Cássia Bicudo, doctoranda en el area de reproducción animal, Adriano Felipe Perez Siqueira, doctorando en el area de reproducción animal; Robinson André Words Doctorando en el Área de reproducción animal; Tamie Guibu de Almeida, maestranda en el área de reproducción animal. Quienes mostraron el mayor interés en brindar su experiencia para la obtención de conocimiento práctico y teórico en base al tema.

Después de una charla tutorial detallando cada una de las instalaciones y funciones de los equipos utilizados por el VRA. Las labores fueron encaminadas hacia la producción de embriones *in vitro* (PIV) biotecnología que estaba siendo desarrollada para evaluar resultados del doctorando Adriano Felipe Perez Siqueira, inicialmente acompañando los trabajos, luego apoyando la investigación y por último haciendo parte del proceso como tal.

5. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN *VITRO*

Según Machaty, Peippo & Peter (2012):

La producción de embriones *in vitro* abarca los procesos de evaluación de donadoras, colecta, maduración de ovocitos, (MIV) fecundación de ovocitos (FIV), cultivo de embriones cigotos hasta la fase de blastocistos (CIV) y transferencia de embriones; entre otros procesos no tan mencionados pero con la misma importancia. A continuación se hace una descripción de los procesos:

5.1. Transporte de los ovarios

Para el transporte del material (ovarios) obtenidos de vacas para sacrificio en el matadero es necesario sumergir los ovarios obtenidos en solución salina a 0,9%, con adición de antibióticos, y temperatura entre 30 y 36 °C (Figura 1), son transportados en un termo herméticamente sellado, esto con el propósito de mantener los ovarios viables durante el tiempo que se requiera hasta llegar al laboratorio Castro (2014).



Figura 1: Ovarios provenientes del frigorífico en solución salina al 0,9%.
Fuente: Murillo, 2016.

5.2. Lavado de ovarios y aspiración de los folículos.

Los ovarios llegan al laboratorio y en este son lavados y sumergidos en solución salina con las mismas condiciones de la solución que fue transportada, se prepara una mesa previamente desinfectada con alcohol.

De acuerdo a lo descrito por Renzi (2012) los ovarios son:

Extraídos de la solución para cercarlos en servilletas de papel estériles, efectuando la aspiración, con agujas de un calibre 21G corta, se aspira el fluido folicular y con ello cada uno de los ovocitos, este fluido se deposita en

tubos cónicos de 15 ml (anteriormente dispuesto en baño maría para ser atemperados de 35 a 37°C (Figura 2). El fluido folicular aspirado es depositado de la siguiente manera, se desacopla la aguja de la jeringa depositando el fluido por la pared del tubo evitando así deformidades de los ovocitos por traumas, agitamos de forma suave los tubos con 15 ml de fluido folicular y dejamos en reposo por 10 minutos tiempo en el cual se espera obtener los ovocitos en el fondo del tubo.

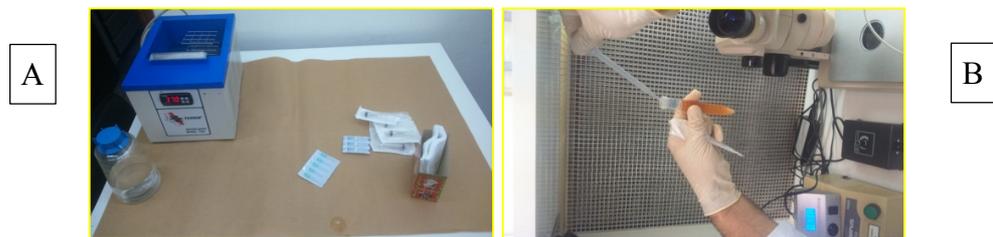


Figura 2: A, equipamiento para aspiración folicular.
Fuente: Murillo, 2016.

5.3. Aspiración folicular (*Ovum Pick Up*)

Es usada comercialmente para la producción de embriones, aunque también se han realizan trabajos con la aspiración folicular guiada por ultrasonografía para investigación. Esta técnica permite la recuperación de embriones sin la necesidad de utilizar hormonas. Con la eficacia de poder ser utilizada con más continuidad que la superovulación de embriones. Galli, et al., (2000).

Según De Roover, Genicot, Leonard, Bols y Dessy (2005):

El procedimiento de aspiración folicular es realizado utilizando agujas calibre 19, ajustando una presión al vacío de 72 hasta 78 mmHG, 12 ml/min, conectados a tubo falcon de 50 ml, con medio TCM 199 Sigma M4530, tampón HEPES Sigma H-0763, 2% de suero Fetal bovino, antibióticos y heparina. Para la visualización de la imagen se usa un equipo de ultrasonido con un transductor micro convexo, de 5 a 7,5 MHZ, conectado a una guía de biopsia, introducida hasta el fondo de la vagina (Figura 3). Los folículos a ser aspirados son posicionados en la punta de la guía visualizando así las estructuras en el monitor del ecógrafo.

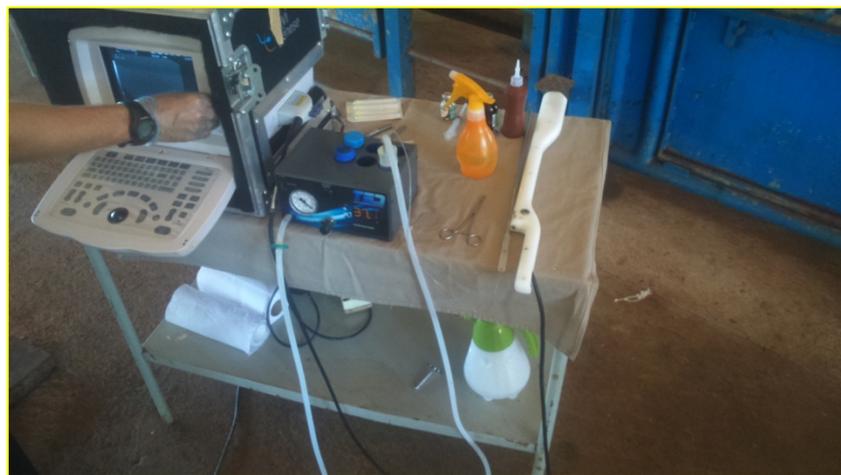


Figura 3: Equipamiento para aspiración folicular
Fuente: Murillo, 2016.

5.4. Preparación de equipos

Antes de iniciar el proceso de rastreamiento, lavado y selección de los ovocitos es necesario preparar el equipamiento.

Se enciende la cámara de flujo laminar, aplicamos sobre esta kilol y Alcohol como desinfectantes, por último se activa la lámpara de UV por tiempo determinado generando un ambiente estéril en la zona de trabajo.

Además de lo anterior se utilizan placas de petri estas son marcadas y señalizadas con líneas que la atraviesan toda, para efectuar una búsqueda organizada y más efectiva de los ovocitos en el fluido folicular.

Se encienden las placas de calefacción ubicadas sobre los estereoscopios y en la base del flujo laminar, esto para mantener la temperatura lo más estable posible en los ovocitos; se revisan las punteras, micropipetas que son de uso cotidiano en las etapas de la PIV (Figura 4). Se calibra el diámetro de los capilares para la manipulación de los ovocitos verificando temperatura, CO₂ y la humedad de la incubadora donde se van a efectuar procesos de maduración, fertilización de ovocitos y cultivo embrionario.



Figura 4: Equipos para procesos de MIV FIV CIV.
Fuente: Murillo, 2016.

5.5. Preparación de medios

De acuerdo a los protocolos establecidos por cada laboratorio se pueden utilizar diferentes medios hoy día los más utilizados en la PIV son los siguientes:

Galli et al., (2003) afirma que:

El medio para maduración más utilizado en la PIV es TCM 199 como solución stock (bicarbonato o HEPES de acuerdo al caso) enriquecido con una fuente de energía, una fuente proteica, más un compuesto bactericida o bacteriostático, LH, FSH y estradiol hormonas utilizadas en los procesos de maduración, ya que se ven involucradas en fases decisivas, progresión de los ovocitos tanto *in vivo* como *in vitro*.

El método para separación de espermatozoides percoll al 90% y 45% ha sido ampliamente utilizado. Según Oliveira et al., (2011):

El uso del percoll se basa en la capacidad de movimiento de los espermatozoides para atravesar medios de diferentes densidades por medio de la centrifugación. Oshio (1988) afirma que el percoll está compuesto por partículas de sílice coloidal de 15 a 30 nm de diámetro cubierto por polivinilpirrolidona (PVP), utilizado para seleccionar los espermatozoides viables antes de la fertilización de los ovocitos.

El medio KSOM según Nedambale et al., (2004):

Es uno de los medios de cultivo, donde los presumibles embriones van a desenvolverse hasta la fase de blastocisto. Este medio igual que el TCM 199 es enriquecido con diferentes compuestos, aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales, albumina serica y suero fetal bovino.

De igual manera Nedambale et al., (2004) destaca que:

La cualidad de utilizar el medio SOF cuando las condiciones de cultivo no tienen parámetros medibles de oxígeno, utilizándolo como co cultivo para los embriones, normalmente se usan los mismo compuesto enriquecedores que el

medio KSOM, con la particularidad que el co cultivo se basa en la adición de células de alguna estructura del tracto reproductivo pudiendo ser células del cumulus, células del endometrio y/o células del oviducto, el objetivo de cultivar estas células junto con los cigotos es evitar los daños generados por el aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno en el medio siendo este un factor determinante para el desarrollo embrionario.



Figura 5: Preparación de medios para maduración in vitro de ovocitos
Fuente: Murillo, 2016.

5.6. Maduración de ovocitos

5.6.1. Fisiología de la maduración

Lonergan y Fair (2016) destacan que:

La maduración ovocitaria es el acontecimiento fisiológico que precede y es necesario para el éxito de la fertilización y desenvolvimiento embrionario.

Los ovocitos de la mayoría de los mamíferos entran en estadios iniciales de la meiosis durante la vida fetal, teniendo su primer bloqueo en la fase de diploteno, profase I también llamado bloqueo en fase de vesícula germinativa.

Fair, Hyttel y Greve (1995) concluyen que ovocitos de bovinos alcanzan su tamaño completo cuando el folículo que los encierra llega hasta un diámetro de aproximadamente 3 mm.

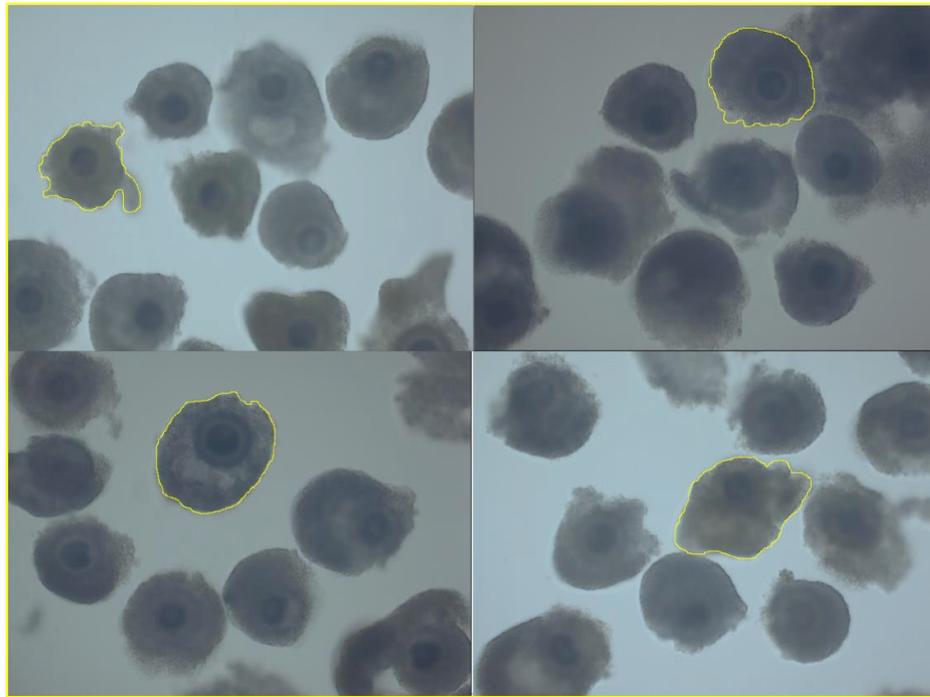


Figura 6: Ovocitos seleccionados para maduración *in vitro*, nótese las células del cumulus compactas .

Fuente: Murillo, 2016.

Parrish en el año 2013, determinó que el periodo de crecimiento inicia cuando el ovocito primario está en estadio de diploteno de la profase I (momento del nacimiento o los primeros días de nacimiento), seguido de la interrupción de la división meiótica del ovocito primario.

La maduración completa de los ovocitos es de gran importancia para la producción de embriones *in vivo e in vitro*, es la responsable por la ruptura de la vesícula germinativa, seguida por la retomada de la meiosis (Lonergan & Fair, 2016).

Kussano, Leme, Guimarães, Franco y Dode, (2016) demostraron que:

La retomada de la meiosis permite el establecimiento de una relación entre las células del complejo cumulus ovocito (COC) de manera bidireccional, y la construcción de un microambiente folicular apto para el correcto desenvolvimiento de las células COC y del embrión inicial (Figura 6).

La capacidad intrínseca del ovocito de retomar y efectuar la meiosis, soportar la fecundación, permitir el desenvolvimiento del embrión pre-implantación y el posterior desenvolvimiento fetal hasta generar un producto final saludable recibe el nombre de capacidad de desenvolvimiento ovocitario (Sirard et al. 2006 citado en Gilchrist, 2011).

Estudios *in vivo* demostraron que:

El pico de hormona luteinizante (LH) desencadena la maduración del complejo cumulus ovocito (COC) por intermedio de las células de la granulosa (CG), cuando el receptor para LH es expresado en niveles fisiológicamente relevantes en las células cumulus y en el ovocito (Peng et al, 1991; citado en Richards et al., 2002).

La LH se une a receptores acoplados a la proteína G específicos, activando la enzima adenilato ciclasa hormona convertidora de ATP en cAMP. El cAMP actúa como segundo mensajero, participando en los mecanismos de control y retomada de la meiosis, estereoidogenesis, expansión de la células del cumulus y metabolismo energético. El aumento de la concentración intra ovocitaria de cAMP hace que el ovocito se mantenga en bloqueo meiótico,

(permaneciendo en profase I), suprimiendo el factor promotor de la maduración (Peng et al, 1991, citado en Richards et al., 2002).

Norris et al (2009), leído en Vaccari et al, (2009) demostraron que:

El ovocito tiene mecanismos propios capaces de controlar tal concentración de cAMP por medio de la síntesis de fosfodiesterasa tipo 3 (PDE3), la cual degrada el cAMP. El estímulo gonadotrófico ovulatorio resulta en el descenso de la concentración de cGMP en el ovocito y en el folículo, causando un aumento de la actividad de la PDE3, con el consecuente aumento de la degradación de cAMP, llevando a la reducción de la supresión del factor promotor de la maduración (MPF) y a la retomada de la meiosis (Peng et al, 1991, citado en Richards et al, 2002).

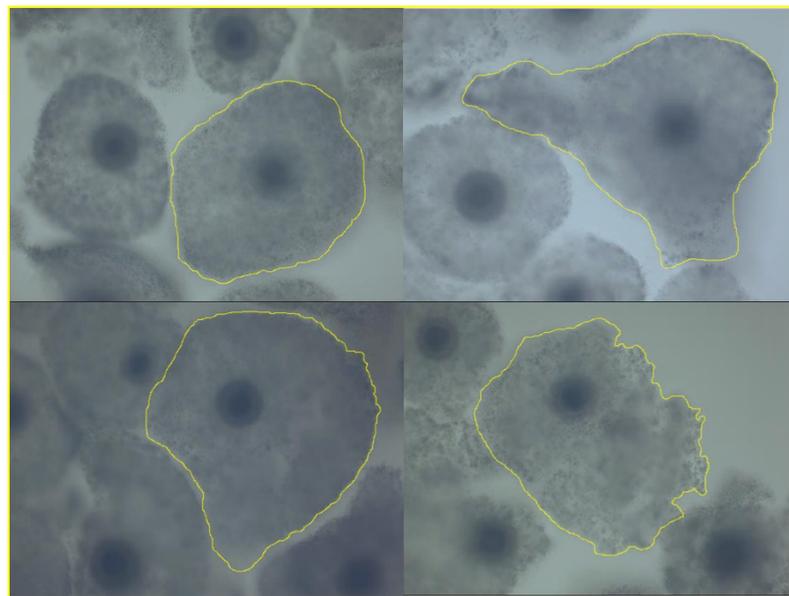


Figura 7: Ovocitos con 24 horas de maduración aptos para fecundación, células de cumulus expandidas por acción de la hialuronidasa.

Fuente: Murillo, 2016.

5.6.2. Metabolismo del complejo cumulus ovocito durante el proceso de maduración

Diferentes sustancias y concentraciones de sustratos incorporados al medio de maduración *in vitro* alteran el perfil metabólico de las células somáticas y el proceso de maduración de los ovocitos (Figura 8).

Un mayor conocimiento sobre los procesos metabólicos realizados por el complejo cumulus ovocito COC, permite mejorar las condiciones de maduración *in vitro* de las estructuras que son sometidas a maduración *in vitro* (Sutton et al. 2003).

La expansión de las células del cumulus está vinculada a la secreción de una matriz rica en ácido hialurónico (AH) por las células del COC, y la expresión de una variedad de proteínas necesarias para la correcta composición y estabilización de la matriz (Figura 7). Esta expansión es efectuada después de la inducción de gonadotropinas pré-ovulatorias de LH *in vivo*, y por la suplementación de FSH al medio de maduración *in vitro*. (Caixeta, Machado, Ripamonte, Price & Buratini, 2013).

Este estímulo desencadena cascadas bioquímicas intracelulares que terminan en la expresión de genes y producción proteica, dentro de los principales genes envueltos en la expansión encontramos: hialurona sintase 2 (HAS 2), prostaglandina sintase 2 (PTGS2, también denominada COX2), proteína inductora de factor de necrosis tumoral 6 (TSG6) y pentraxina 3 (PTX3), Park et al, (2004). Sin embargo todavía se requieren más estudios en base a estos procesos.

Tabla 1 : Medio base para maduración de ovocitos in vitro

Reactivo	Fabricante	Catálogo	Concentración
Médium 199	Gibco	31100-035	---
NaHCO₃	Sigma	s-8875	2,2% (m/v)
Agua milli-Q			1 L
Ph 7,2			

Fuente: Murillo, 2016.

Este medio base es modificado conforme a la rutina de cada laboratorio, generalmente, se adiciona L-glutamina, bicarbonato de sodio, HEPES, piruvato de sodio, y hormonas (Tabla 2). Respecto a las hormonas es usual utilizar LH y FSH. (Choi et al., 2000)

Tabla 2: Medio para lavado MIV (Pre MIV)

Reactivo	Fabricante	Catálogo	Concentración
M-199 con HEPES	Gibco	12380-028	90% (V/V)
Piruvato	Sigma	P-4562	0,2 mM
Gentamicina	Sigma	G-1264	50 ug/ml
Suero fetal bovino	Gibco	16140-014	10% (V/V)

Fuente: Murillo, 2016.

Algunos laboratorios en la actualidad también utilizan el 17-B estradiol o un sintético de este, además del uso de aceite mineral sobre la placa de medio de cultivo evitando la evaporación de las diferentes sustancias que componen al medio. (Beker-van Woudenberg., 2006).

Según Caixela., 2013:

La adición de suero fetal bovino al medio de maduración es utilizada como requisito para alcanzar la perfecta expansión de las células de cumulus y maduración del ovocito. Mejores índices de maduración se han descrito con

suero de vaca en estro, no obstante existen innumerables componentes del suero que pueden afectar de forma positiva o negativa los resultados de PIV.

Tabla 3: Medio de maduración *in vitro*.

Reactivo	Fabricante	Catálogo	Concentración
M-199 con bicarbonato	Gibco	11150-026	90%
Suero fetal bovino	Gibco	16140-014	10%
Piruvato	Sigma	P-4562	0,2%
Gentamicina	Sigma	G-1264	50 ug/ml
FSH	Sigma	12030-093	0,5 ug/ml
LH	Sigma	13030-010	1 ug/ml
Filtrar en 0.22 um			
Estradiol	Sigma	E-4389	1 ug/ml

Fuente: Murillo, 2016.

Además del medio, otros factores relacionados con el medio ambiente de cultivo celular deben ser considerados como fundamentales para el desenvolvimiento embrionario. Para eso es necesario una incubadora que mantenga una atmosfera gaseosa y temperatura constante. Generalmente la maduración de ovocitos bovinos se realiza a 39°C por 22 a 24 horas en atmosfera de 5% de CO₂ con aire y humedad saturada (Choi et al., 2000).

5.7. Capacitación espermática

Los espermatozoides son en función infértiles e inmóviles cuando se encuentran en el testículo solamente adquieren capacidad de conseguir la fecundación cuando se localizan en el epidídimo (Parris., 1989).

La mayor parte de los cambios en el epidídimo están relacionados con la adquisición de motilidad y en menor grado con morfología y metabolismo (Parris, 1989).

La maduración espermática es:

un reflejo de las modificaciones bioquímicas del espermatozoide entre las que se encuentran: estabilización de la cromatina y de las estructuras de la cabeza y cola, estabilización de la membrana plástica para la absorción y/o integración con glicoproteínas epidimarias, adquisición del movimiento progresivo y habilidad para ligarse a la zona pelúcida (Barend, Gadella & Luna 2014).

La capacitación espermática es de vital importancia, permite que espermatozoides estén aptos y lleguen a fecundar. In vivo este proceso ocurre en el tracto femenino por la remoción de agentes decapacitantes, con pocas modificaciones morfológicas, y el aumento de reacciones bioquímicas que resulta en desestabilización (fluidez) de la membrana plástica, y por consiguiente una hiperactivación espermática, de gran importancia para que sea efectuada la reacción acrosomal y la penetración del espermatozoide en el ovocito (Barend et al., 2014).

A *grosso modo* los protocolos de fertilización *in vitro* fueron elaborados para imitar los efectos del oviducto, el semen es naturalmente descongelado a 37° C por 1 minuto; para ser lavado en un gradiente de densidad (percoll, ficoll, androcoll entre otros) en el fondo de un tubo eppendorf se localizan los espermatozoides con mayor densidad (*pellet*) que tuvieron la capacidad de atravesar diferentes gradientes de densidad, no obstante los

espermatozoides con capacidad de llegar al fondo del tubo son recolectados para volver a ser lavado en medio de FIV.

Los objetivos del gradiente por densidad son:

Separar el plasma seminal y factores de decapitación, retirar las soluciones de criopreservación de los espermatozoides, separar los espermatozoides de mayor densidad (espermatozoides con mayor posibilidad de ser capacitados) de aquellos sin capacidad de atravesar los gradientes. (Machado et al., 2009)

5.7.1. Procedimiento percoll

La técnica del uso del percoll® según Castro (2014):

Se basa en la capacidad de movimiento de los espermatozoides para atravesar medios de diferentes densidades. El proceso inicia con la descongelación del semen a 37°C por 30 segundos en descongelador electrónico de semen fertilize®. Posterior a ello se secan la pajilla.

Se adiciona el volumen de semen de la pajilla utilizando tubos eppendorf previamente dispuestos con 400µl de percoll® 45% y 400µl de percoll® 90% temperados a 37°C, después de ello se centrifuga a 9000 g por 5 minutos obteniendo pellet en el fondo del tubo.

El pellet es pipeteado en un volumen estándar (100µl). Estos 100µl de cada tubo son dispuestos para ser lavados, se lavan a 9000 g por 3 minutos en 1 ml de medio FIV.

Se obtienen 100µl de cada pellet, se evalúa concentración y se ajusta a 100.000 células en 4µl de medio FIV, lo que corresponde al volumen para

inseminar cada gota de medio FIV con 20 ovocitos.(Parrish, Parrish, Winer, & First 1988)

5.8. Fertilización *in vitro*

La fertilización es un proceso dispendioso, que resulta de la unión del gameto masculina con la gameta femenina, lo que permite el inicio del desenvolvimiento de un nuevo individuo.

Consiste en la interacción entre los componentes del ovocito y del espermatozoide, activándose la segunda división meiótica del ovocito y la restauración del número cromosómico del individuo (Leibfried-Rutledge, Critserl, Parrish & First, 1989).

La descondensación de la cabeza del espermatozoide ocurre dentro de 1 a 2 horas de haber penetrado al ovocito y el pro núcleo masculino se forma de 3 a 5 horas. (Barend, Gadella & Luna, 2014).

Como ya se describió anteriormente el semen criopreservado se descongela y somete a gradiente percoll donde los espermatozoides con capacidad de movimiento son seleccionados de aquellos teóricamente muertos.

La exposición de los espermatozoides con los ovocitos en el medio FIV gota es en promedio de 18-20 horas en donde la célula espermática debe tener la capacidad para fecundar la gameta femenina atravesando las células del cumulus y sufriendo reacción acrosomal, lo cual permite la penetración a la zona pelúcida, formando los pronúcleos femenino y masculino lo anterior es descrito por, Wang et al., (2013).

Usualmente los laboratorios de producción de embriones in vitro utilizan como medio base para el proceso lavado pre fecundación el medio TCM 199 con HEPES. Enriquecido con albumina sérica (BSA- V), piruvato y gentamicina. (ver tabla 4)



Figura 9: Fecundación in vitro, gotas con los ovocitos dispuestos micropipeta en inclinación no mayor a 45°, 4 ul de semen por gota (100.000 espermatozoides).

Fuente: Murillo, 2016.

5.8.1. Procedimiento

Medio pre FIV: Utilizado para el lavado de los ovocitos anteriormente madurados en (MIV) estos ovocitos con 22 a 24 horas de maduración son aspirados con un capilar de punta gruesa-bucal y depositados en una de las 3 gotas de pre FIV, los ovocitos pasan por las 3 gotas. Estas deben contener 200 μ l, puestos en una placa de petri grande. Un número no mayor de 120 ovocitos para el lavado en las 3 gotas, después de ello se efectúa el mismo procedimiento en la misma placa solo que adicionando 3 gotas de Medio FIV gota.

Pre FIV está compuesto por BSA-V . TCM 199 con HEPES, piruvato y gentamicina (tabla 4). Es un requisito la filtración del medio (Filtrado de 0,22

µl filtro para jeringa). Se guarda en la incubadora a 38,5° C, totalmente cerrado a humedad saturada, esperando ser utilizado.

Tabla 4: Medio de lavado FIV (Pre FIV).

Reactivo	Fabricante	Catálogo	Concentración
M-199 con Hepes	Gibco	12380-028	10 ml
BSA- V	Sigma	A-9647	0,003% (m/v
Piruvato	Sigma	P-4562	0,2 mM
Gentamicina	Sigma	G-1264	50 ug/ml
Filtrar en 0,22 um			

Fuente: Murillo, 2016.

Medio FIV: La elaboración de medio FIV tiene cuatro necesidades principales, una es el uso de este para el lavado de los espermatozoides (1000 µL de FIV) después de ser seleccionados en Percoll, la segunda es el uso de este como unos de los compuestos importantes en la confección del medio FIV gota, para diluir el pellets en 25 millones de espermatozoides por ml, y menos importante para diluir diferentes muestras espermáticas en el análisis de motilidad.

Tabla 5: Medio FIV.

Reactivo	Fabricante	Catálogo	10 ml
TL- STOCK			10 ml
BSA- Libre de ácidos grasos	Sigma	A-7511	0,006% (m/v
Piruvato 0,2 nM	Sigma	P-4562	0,20 ul
Gentamicina 50 ug/ml	Sigma	G-1264	50 ul
Filtrar en 0,22 um			

Fuente: Murillo, 2016.

En la preparación de FIV utilizamos BSA- Libre de Ácidos Grasos (sigma A 6003), TL-Stock, Piruvato y Gentamicina (tabla 5). También se realiza filtrado del medio, filtro de 0,22 μ l para acoplar en jeringa, se guarda dentro de la incubadora a humedad saturada con 38,5° C y 5% de CO₂.

FIV Gota: Medio FIV gota es el medio final de la fertilización o fecundación in vitro en el que se depositan los ovocitos después del proceso de lavado en pre FIV y FIV gota. También se adicionan los espermatozoides después de ser seleccionados en percoll y lavados en FIV.

El medio FIV gota está compuesto por medio FIV, Heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina (PHE) y agua ultra pura (tabla 6). Después de su elaboración este se almacena en la incubadora a 38,5° C abierto a media rosca para equilibrar el pH, a 5% de CO₂ en humedad saturada, esperando a ser utilizado.

Tabla 6: Medio FIV gota.

Reactivo	Fabricante	Catálogo	4 ml
Medio FIV			3,640 ml
Heparina 140 usp	Sigma	H- 9399	40 ul
PHE			160 ul

Filtrar en 022 ul

Fuente: Murillo, 2016.

Normalmente se colocan por cada 20 ovocitos 90 μ L de FIV gota dichas gotas son depositadas en placas con el mismo procedimiento de MIV anteriormente descrito, son rotuladas con la información necesaria, y separadas de acuerdo a los ovocitos de las diferentes donadoras y al semen de diferentes

toros. La incubación de los ovocitos con los espermatozoides (fecundación) dura 18 horas (Figura 9).

Es importante recordar que en el medio FIV gota se adicionan normalmente primero los ovocitos y después los espermatozoides estos últimos en un volumen de 4 μ l en una concentración de 100 mil espermatozoides por gota (Figura 9).

5.9. Cultivo de embriones

Elaboración de KSOM: Se puede elaborar medio KSOM el mismo día que se elaboran los medios para fecundación, está compuesto por BSA EFAF (sin ácidos grasos esenciales) 0,3mg/ml (0.0180g para 6 ml) (0.012g para 4 ml), Gentamicina 10mg/ml (1,5 μ l para 6 ml) (1 μ l, para 4 ml) de KSON stock, aminoácidos esenciales (120 μ l para 6 ml) (80 μ l para 4 ml) y aminoácidos no esenciales (60 μ l para 6 ml) (40 μ l para 4 ml) (ver tabla 7) .

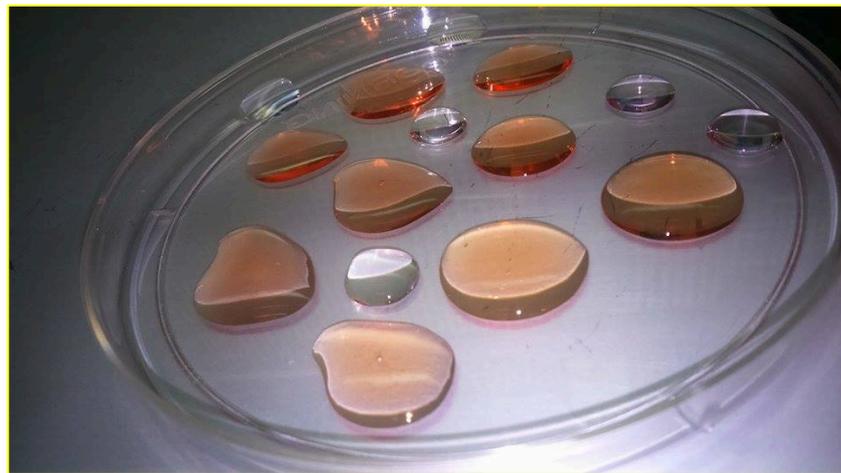


Figura 10: Disposición de gotas color naranja medio Pre FIV, color translucido medio KSOM, para lavar los posibles cigotos ya fecundados.

Fuente: Murillo, 2016.

Luego de transcurrir el tiempo de fecundación los posibles cigotos son aspirados con ayuda del bucal y un capilar siliconizado de un calibre mucho

más pequeños que los usados para MIV, FIV, esto con el propósito de retirar el contenido de las células del cumulus., se realiza como en las anteriores etapas el proceso de lavado en 3 gotas de medio pre FIV cada una de 330 μL \Rightarrow (1ml dividido en las 3 gotas) y 2 gotas de medio KSON con un volumen de 100 μl (Figura 10), después de esto los probables cigotos son adicionados en medio KSON (60 μl por gota), e incubados a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad saturada.

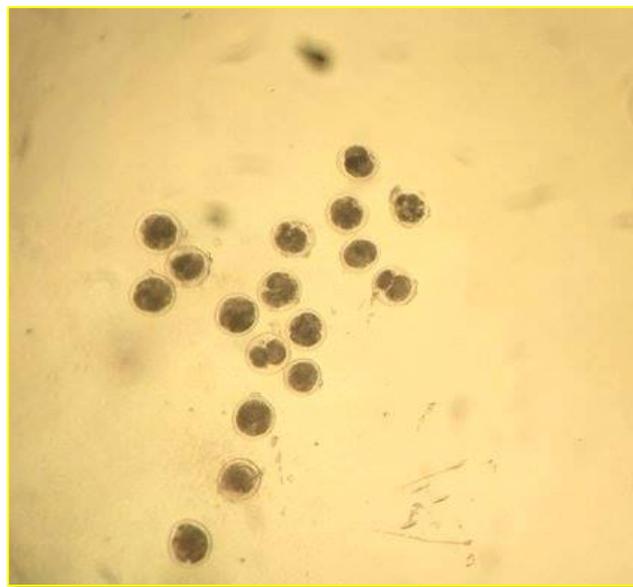


Figura 11: Embriones en diferentes estadios de desarrollo.
Fuente: Murillo, 2016.

Al cabo de 3 días es necesario retirar 30 μL de medio, adicionar 30 μL de KSON suplementado al 10% de suero fetal bovino (SFB) para terminar con una concentración de 5% de SFB y de esta manera renovar el medio CIV; preferiblemente en esta etapa del cultivo de embriones son separados en gotas diferentes los clivados de aquellos que no clivaron (Figura 11). Al día 5 de cultivo se adiciona otros 30 μl de KSON con 5% de SFB, finalmente se evalúa el % de blastocisto el día 7 de haber iniciado el cultivo (Figura 12).

Tabla 7: Medio de cultivo *in vitro* (CIV)

Reactivo	Fabricante	4 ml
KSOM	Millipore	4 ml
EFAF BSA	Sigma	0,012 g
Aminoácidos no esenciales	Sigma	80 ul
Aminoácidos esenciales	Sigma	40 ul
Gentamicina	Sigma	1 ul

Fuente: Murillo, 2016.

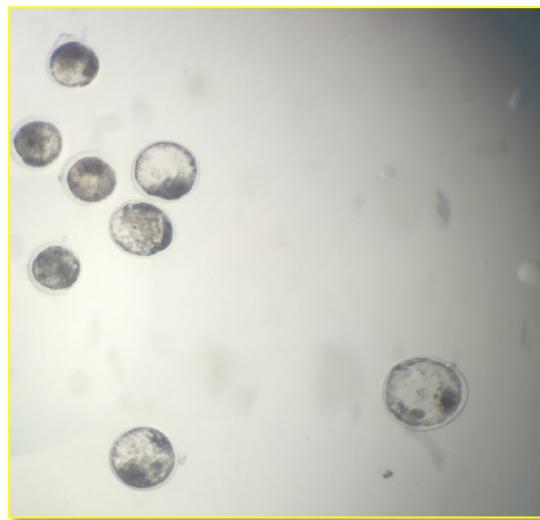


Figura 12: Embriones en estadio de blastocitos (inicial, blastocito, expandido).

Fuente: Murillo, 2016.

6. CURSOS TEÓRICO PRÁCTICOS

Además de la participación constante en los procesos de producción de embriones *in vitro*, se cursaron disciplinas teórico prácticas para estudiantes de pos graduación entre los que destacan:

- Maduración ovocitaria en bovinos.
- Capacitación espermática en bovinos.
- Fecundación de ovocitos y cultivo de embriones.

- Desenvolvimiento embrionario pre implantación.
- Papel del análisis proteomica en el estudio de la fertilidad masculina.
- Criopreservación de espermatozoides.
- Célula tronco y terapia celular en medicina veterinaria.
- Aspiración de folicular con ultrasonografía en bovinos.
- Colecta, evaluación y congelación de embriones.
- Foliculogénesis.
- Base farmacológica para el control del crecimiento folicular y de la ovulación.
- Factores ambientales que interfieren en la cualidad ovocitaria y en la fertilidad.
- Técnicas de sincronización de la ovulación en vacas de carne.
- Técnicas de sincronización de la ovulación en vacas de leche.
- Control del crecimiento folicular para la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.
- Empleo de biotecnologías de la reproducción en Italia: metodologías de evaluación ultrasonografía del cuerpo lúteo.

7. CONCLUSIONES

La posibilidad de obtener múltiples crías por aspiración folicular de una donadora con alto valor genético, carente de facultad para llevar a término una gestación es una de las virtudes que presenta la producción de embriones *in vitro*.

La producción *in vitro* de embriones, junto con la aspiración folicular guiada por ultrasonografía permite aumentar el potencial de hembras de alto valor genético.

La optimización de esta técnica mejora cada vez mas la producción de embriones de buena calidad, en números cada vez mas alto de estos, gracias a la disminución de algunos problemas que han limitado su uso en escala comercial. De este modo contribuirá para disminución de los costos operacionales de la PIV, que todavía es alto en cuestión de materiales y equipamientos utilizados, lo que posibilitará la difusión de esta tecnología visualizando un aumento en la productividad de la pecuaria mundial.

El mayor impacto de la PIV, todavía es la aplicación asociada a semen sexado. Esto porque con una sola dosis inseminante se llega a obtener un número alto de los embriones de un mismo sexo. Pudiendo ser aplicado por ejemplo para el recambio de todas las matrices de una misma producción.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

RELACIÓN ENTRE EL VOLUMEN DE SEMEN Y LA CONCENTRACIÓN FINAL DE ESPERMATOZOIDES MEDIANTE EL MÉTODO PERCOLL

Presentado al programa de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias
Agrarias de la Universidad de Pamplona como requisito para optar al título de
Médico Veterinario

Tutor: MVZ, ESP. Luis Ernesto Quintero Rodríguez

Por John Camilo Murillo Sánchez

® Derechos Reservados, 2016

8. INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* en los últimos años ha sido una de las biotecnologías más aplicadas en los países de desarrollo pecuario, esta comprende diferentes etapas cruciales, en la obtención de embriones aptos para la transferencia, entre ellas destacan la aspiración folicular, selección de ovocitos, maduración *in vitro* de ovocitos, fertilización *in vitro* de ovocitos y el cultivo de embriones. El proceso de FIV y en este la fecundación es quizás si no el mas importante uno de los de mayor interés. Un proceso necesario en la fertilización *in vitro* de ovocitos es la selección y capacitación de los espermatozoides viables, donde el objetivo esta puesto en obtener una célula espermática con capacidad de fecundación y características que beneficien el posterior desenvolvimiento embrionario.

Algunos métodos son viables en la preparación de semen para FIV, sin embargo la centrifugación con gradiente de Percoll es el método de rutina mas utilizados en los laboratorios comerciales. Lee, Kim, Ji, & Kim (2009)

El Percoll es una suspensión coloidal de sílice revestido por polivinilpirrolidona (Noguchi, Yoshioka, Hikono, Iwagami, Suzukiand, & Kikuchi (2013). Utilizado en diferentes gradientes de densidad para la separación del: crioprotector, restos celulares, espermatozoides muertos de las células espermáticas móviles (Oshio, 1988)

En la investigación se consideraron distintos volúmenes de semen esto con el objetivo de identificar un volumen estándar donde se pueda mejorar la cantidad y calidad del esperma para la posterior fecundación de ovocitos.

9. HIPÓTESIS

Reducir el volumen de semen inicial, mantiene los parámetros espermáticos, con una considerable recuperación de células espermáticas finales; mientras que el aumento de volumen es inverso al número de espermatozoides después de “cierto punto”, y muda los parámetros de las células espermáticas.

10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que los avances en la producción de embriones *in vitro* se han ido acrecentando a gran escala, todavía se obtienen tasas de producción de embriones bajas, 30% respecto al total de ovocitos aspirados Galli, (2003). Factores en el gameto masculina se han mencionado como causantes directos de que la producción de embriones *in vitro* no aumente su porcentaje.

El procedimiento de fertilización *in vitro* inicia con la separación de células viables de las muertas, para conseguir mejores índices de fertilización, y en este se utiliza un gradiente percoll.

En estudios efectuados por Simões, (2013) se afirma que utilizar volúmenes elevados de semen para percoll afecta la recuperación final de espermatozoides para FIV representada en menor número de células viables para fertilización de ovocitos, por ende menor número de ovocitos fertilizados siendo una problemática de relevancia para todo el proceso de producción de embriones.

11. JUSTIFICACIÓN

En la siguiente investigación serán medidos diferentes volúmenes de semen inicial. Para someterlos a gradiente percoll (400µl de percoll al 45% y 400µl de percoll 90%) en tubo *ependorf* sometidos a centrifugación esto para identificar los espermatozoides con capacidad de alcanzar el fondo del tubo (Castro., 2014). Buscando así el volumen ideal donde se observe mayor motilidad y concentración espermática final (pos percoll).

La investigación esta enfocada en mejorar los protocolos para la fertilización in vitro de embriones y el sub siguiente desenvolvimiento embrionario. En la mayoría de los laboratorios comerciales para producción de embriones in vitro se utilizan pajillas tanto de 0,25 ml como de 0,50 ml, es demostrado en algunas investigaciones (Machado et al., 2009) que al utilizar 0,50 ml de semen para grandiente percoll, las concentración espermática pos centrifugación en el fondo del tubo disminuyen . El beneficio económico se vería reflejado en la utilización de menor volumen de semen para obtener mejores resultados finales.

Se plantea la posibilidad de utilizar una pajilla de 0,50 ml para dos manipulaciones de percoll sin alterar los procesos de fecundación in vitro, y obteniendo mejore recuperación de células espermáticas pos percoll, lo que traería grandes beneficios económicos, ya que los laboratorios utilizarían una pajilla donde normalmente se utilizan dos.

Algunos estudios han investigado en base al gradiente percoll sin embargo las investigaciones se han dirigido a (Oliveira et al., 2011) efectos discontinuos de percoll, (Machado et al., 2009) fuerzas de centrifugación, diferentes concentraciones de percoll; sin tener en cuenta el volumen de semen

depositado, y en este, que el número de células muertas puede afectar (obstaculizar) el libre recorrido por los gradientes de percoll de las células espermáticas con capacidad de movimiento, es por ello que se establece esta investigación.

12. OBJETIVO

12.1. Objetivo general:

Identificar el volumen de semen bovino usado en la selección por gradiente de percoll que resulte en una mayor concentración y motilidad espermática final.

12.2. Objetivos específicos

Comparar el potencial mitocondrial en los distintos tratamientos antes de la selección pos percoll y después de la misma .

Evaluar la integridad de la cromatina para los cuatro tratamientos pos percoll.

Evaluar el efecto de los diferentes volúmenes de semen en los parámetros de motilidad espermática.

Evaluar la integridad de la membrana plasmática en los cuatro tratamientos pos percoll.

13. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍA

13.1. Producción *in vitro* de embriones bovinos

La producción de embriones *in vitro* (PIV) en bovinos es vista como un alternativa para los programas de reproducción asistida, además de su relevancia en estudios biotecnológicos es fundamental para aumentar la difusión de los animales con alto valor genético.

La PIV comprende las etapas de maduración (MIV), fecundación (FIV) de ovocitos, cultivo (CIV) de cigotos y estructuras embrionarias.

En cuanto al ciclo estral apenas un ovocito se desenvuelve hasta la ovulación, con la PIV se espera que numerosos ovocitos que sufrirían regresión, se tornen embriones, lo cual permite que su aplicación sea comercial (Merton et al., 2003).

13.2. Aspiración folicular de ovarios de matadero

El uso de ovocitos de vacas de matadero actualmente se destina a las investigaciones en producción de embriones *in vitro* y criopreservación de embriones (Hasler et al., 1995). Sin embargo su utilización presenta algunas desventajas como desconocimiento del estado de salud o el patrón hormonal de los animales.

Yang, Jiang, & Foote. (1993) demostraron que ovocitos obtenidos de ovarios colectados en matadero, conservados entre 24-25°C en solución salina fosfato tamponada (PBS) durante 11 horas continuaban viables, con un índice de clivados y porcentaje de blastocistos comparables con los ovocitos obtenidos enseguida del matadero.

13.3. Aspiración folicular guiada por ultrasonografía

La aspiración folicular guiada por ultrasonografía o *Ovum Pick Up* (OPU) es una técnica inicialmente utilizada para el uso en la reproducción humana, sin embargo en 1988, Pieterse, Kappen, & Kruij (1988) adaptaron la técnica para el uso en vacas.

Con la ayuda de un ecógrafo y un transductor acoplado a una guía, se realiza la aspiración mediante la introducción de una aguja en el interior de los folículos ováricos. Un sistema de bomba al vacío permite la recuperación de los ovocitos y del fluido folicular hacia un tubo colector. Los ovocitos son transportados hasta el laboratorio, donde se inicia el proceso de producción de embriones in vitro. (García, et al. 2004)

En la aspiración folicular se pueden obtener ovocitos de hembras bovinas a partir de los 6 meses de edad, de vacas preñadas hasta el tercer mes de gestación, o también después del parto (2 a 3 semanas, según Hasler et al., 1995). Brogliatti & Adams (1996) obtuvieron ovocitos de becerras con apenas 6 meses de edad, utilizando un transductor adecuado.

El intervalo entre las sesiones de aspiración folicular influye en la cantidad y la calidad de ovocitos recolectados (Merton et al., 2003). Según, De Roover, Genicot, Leonard, Bols y Dessy (2004) la punción folicular puede ser realizada dos veces por semana, por algunos meses sin perjudicar el desempeño reproductivo del animal.

De esta forma la producción de embriones por aspiración folicular guiada por ultrasonografía y fertilización in vitro es una alternativa para una

mayor producción de embriones un ejemplo claro es que al aspirar una vaca donadora dos veces por semana durante tres meses, es posible producir 5 veces mas embriones de los producidos por TE clásica comparada en el mismo periodo. (Peixer et al, 1997)

13.4. Maduración *in vitro*

La maduración tiene inicio después de la remoción de ovocitos de los folículos ováricos. En bovinos, son necesarias de 20 a 24 horas para que ocurra la maduración nuclear, con la progresión del estadio de diploteno de la profase I de la primera división meiótica para el estadio de matease II (Lonergan, & Fair, 2016).

Luego del tiempo de incubación de la MIV, los ovocitos completan la maduración con la expulsión del primer corpúsculo polar, y están listos para la fecundación (Garcia et al., 2004).

Se sabe que ovocitos madurados *in vitro*, comparados a los *in vivo*, presentan menores tasas de blastocitos después de la fecundación y el cultivo *in vitro* (Takagi, et al. 2001), se puede suponer que la maduración todavía continua siendo un problema en la PIV. Por consiguiente son necesarios otros estudios para el entendimiento de los mecanismos que ocurren durante la retención de la meiosis y la maduración ovocitaria (Lonergan, & Fair, 2016).

13.5. Fertilización *in vitro*

La fertilización es de los procesos de mayor complejidad en la PIV, resulta de la unión de dos gametos, con la restauración del número de

cromosomas somáticos y consecuentemente el inicio del desenvolvimiento de un nuevo individuo .

Los espermatozoides de mamíferos no tienen la capacidad para fecundar los ovocitos inmediatamente después del eyaculado, sin embargo son móviles y con aparente morfología normal. *In vivo* los espermatozoides alcanzan esta capacidad fecundante en el tracto genital femenino. La capacidad de adquirir competencia fecundante fue denominada como capacitación espermática. (Austin, 1951)

De acuerdo con los razonamientos que se han venido realizando para que ocurra la fecundación de los ovocitos, los espermatozoides necesitan estar previamente capacitados. De esta forma, se adicionan agentes capacitantes como la heparina y el calcio ionoforo (Yang et al., 1993), siendo la heparina, el glicosaminoglicano más utilizado para capacitar espermatozoides para la FIV.

En el proceso de fertilización *in vitro* son usados espermatozoides de pajillas de semen congelado. En general, la concentración de espermatozoides usada es de 100 mil células en 4 μ l, siendo calculado de acuerdo con la motilidad y la concentración de la fracción viva de espermatozoides obtenida después de la centrifugación en gradiente percoll. El periodo de incubación de los ovocitos con los espermatozoides varía de 6 a 20 horas. (García, et al. 2004)

13.6. Separación de semen

Métodos de selección de espermatozoides se aplican rutinariamente para la preparación de células espermáticas para la FIV (Machado 2009). Estos procedimientos son utilizados para mejorar las características de la

calidad del esperma, para retirar el plasma seminal, crioprotector y otros residuos.

13.7. Gradiente percoll

De los métodos de selección de espermatozoides el gradiente de percoll es el más utilizado en los laboratorios de fecundación in vitro de la especie bovina (Cesari, 2006, citado en Machado 2009).

Es conocido como percoll, aquellas partículas de sílice coloidal revestidas por polivinilpirrolidona PVP, dispuestas en gradientes discontinuos, sometidos a centrifugación, para conseguir que las células con mayor densidad y capacidad de movimiento progresivo consigan traspasar las concentraciones de los gradientes percoll. Rhemrev J, Jeyendran RS, Vermeiden JP, Zaneveld, (1989) .

Los cambios pos percoll llegan a general alteraciones en el potencial mitocondrial, estabilidad de la cromatina, integridad acrosomal y cambios estructurales-funcionales en la membrana de espermatozoides, estos cambios pueden interferir en la competencia celular y en el proceso de fertilización (Connell et al., 2002).

Los parámetros espermáticos como potencial mitocondrial, integridad del acrosoma, entre otros pueden ser medidos con el uso de sondas fluorescentes, que tienen la capacidad de unirse y de colorar estructuras específicas de la célula, lo que permitira el diagnostico directo (Celeghini, Arruda, Andrade, Nascimento, & Raphael, 2007).

Para la evaluación simultanea de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, función mitocondrial, son utilizadas sondas : Yoduro

de propidio (PI), (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyaninechloride) (FITC). Laranja de acridina (LA) Castro., 2014.

13.8. Análisis convencional del semen

El método clásico de acelerar la viabilidad de los espermatozoides es determinado por la estimativa del porcentaje de células con motilidad progresiva utilizando la microscopia óptica. Sin embargo, a pesar de ser una forma practica y simple de evaluar directamente la actividad metabólica, este método muestra gran subjetividad y variables en los resultados (Garner, et al. 1997)

Joerg, Mel Delarnette, & Marshall (1997) afirma que:

Los análisis de la evaluación seminal como indicadores de la fertilidad del macho incluyen todavía el vigor espermático, determinado visualmente de acuerdo con la intensidad en que los espermatozoides se muevan, la concentración espermática, estimada con ayuda de la cámara de Neubauer, y la evaluación morfológica, en la cual el porcentaje de defectos son clasificados como mayor o menores estos se evalúan microscópicamente.

13.9. Análisis computarizado del movimiento espermático.

En las últimas décadas, diversos sistemas de análisis computarizado del movimiento espermático (“Computer Assisted Sêmen Analyses” - CASA) han sido propuestos y aplicados con el objetivo de aumentar la eficacia y objetividad de la evaluación convencional de semen.

13.9.1. Análisis computadorizado del movimiento espermático

Según Verstegen, Iguer-Ouada, & Onclin, (2002): el sistema CASA se refiere a un sistema automatizado hardware y software que visualiza y digitaliza imágenes sucesivas de los espermatozoides móviles. Estas son posteriormente identificadas y analizadas y de esta forma la trayectoria espermática es establecida.

Los resultados de esos procedimientos son reflejados en una serie de parámetros que definen precisamente el exacto movimiento de cada espermatozoide por tanto, apesar de su alto costo el sistema CASA posibilita mejores detalles de la cualidad del semen analizado, favoreciendo informaciones rápidas y precisas. (Farrel, Presicce, Brockett, & Foote, 1998)

De forma general, las variables de la cinética espermática evaluadas por el sistema CASA son: motilidad total (MT) relación de las células móviles en el total de espermatozoides de la muestra (%), Velocidad de trayecto (VAP), Velocidad progresiva (VSL) indica la velocidad media recorrida en línea recta entre el inicio y el final del transcurso (m/s), Velocidad curvilínea (VCL), Amplitud del delocamiento lateral de la cabeza (ALH), Frecuencia de batida (m), Retilineidad (STR), Células rápidas (RAPID). Arruda (2000)

13.10. Análisis espermático por citometría de flujo

Según Arruda et al., (2007):

Los avances recientes en tecnologías en cuanto a las tinciones celulares han ofrecidos métodos para evaluar la capacidad funcional de espermatozoides de esta forma, la fundida o integridad de las estructuras espermática es

monitoreada por sondas fluorescentes (fluorocromos) las cuales tienen capacidad de unirse y marcar estructuras específicas de las células permitiendo un diagnóstico más fácil y directo, dependiendo de sus características físicas.

13.11. Análisis espermáticos por citometría de flujo

Los espermatozoides son constituidos por varios compartimentos incluso dentro de membranas celulares que deben permanecer intactas y funcionales para garantizar protección y competencia celular.

De este modo la integridad de las membranas es un requisito esencial para el funcionamiento de las diversas estructuras espermáticas y para el proceso de fecundación (Ōura & Toshimori, 1990). Considerándose que la evaluación de diferentes aspectos relacionados con la fisiología espermática garantiza mejor estimativa de la calidad seminal (Celeghini et al 2007., citado en Arruda et al., 2011).

Actualmente una variedad de sondas fluorescentes han sido utilizadas, individualmente o en asociación, para la evaluación de los diferentes componentes celulares, sea por microscopía de epifluorescencia o por citometría de flujo (Oliveira et al., 2012).

Evaluación de las membranas plasmática y acrosomal

La membrana plasmática actúa como una barrera selectiva entre los medios intra y extracelulares siendo responsable por el mecanismo del

equilibrio osmótico y homeostasis celular. Es por ello que la membrana plasmática íntegra es esencial para el mantenimiento de la viabilidad y de la capacidad fecundante del espermatozoide (Õura & Toshimori, 1990).

La integridad de la membrana plasmática es verificada por colorantes fluorescentes específicos para DNA que son impermeables a las membranas intactas. En ese mismo sentido las células que presentan membrana plasmática lesionada son coloradas (Celeghini et al., 2007).

Por ser un fluorocromo estable con afinidad específica por el DNA, el yoduro de propidio (PI) ha presentado éxito en los resultados, tanto en la microscopía de fluorescencia como en el sistema de citometría de flujo para conteo de células, coloreando en rojo el núcleo de células núcleo de células con daños en la membrana plasmática (Olivera et al., 2012).

Además de la integridad de las membranas plasmáticas, la evaluación de la integridad acrosomal viene siendo cada vez más empleada en los análisis de calidad seminal. El acrosoma es un importante organelo espermático con enzimas hidrolíticas. (Õura & Toshimori, 1990).

La unión inicial del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito estimula la liberación y activación de las enzimas acrosomales, que caracteriza el evento denominado reacción acrosomal.

La importancia de la evaluación del acrosoma se debe principalmente al hecho de que la membrana acrosomal íntegra es un factor fundamental para que ocurra la reacción acrosomal, y por tanto para que ocurra la fecundación (Gadela, 2014).

De acuerdo a lo reportado por Cross, Morales, Overstreet, & Hanson, (1986):

El carácter glicoproteico de los componentes acrosomales ofrece un interesante medio de censura a la integridad del acrosoma, por la unión de la matriz acrosomal con marcadores de glicoproteínas a espermatozoides que presenten acrosoma lesionado. En este contexto, la aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) es una sustancia que se une de forma específica a carbohidratos presentes en el acrosoma. Esta aglutinina posee afinidad por residuos glicoproteicos específicos, azúcares-monosídeos encontrados en los contenidos acrosomales. Sin embargo para la visualización del acrosoma lesionado, la PSA debe ser conjugada con fluoresceínas, tales como el isotiocinato de fluoresceína (FITC). De esta manera el acrosoma lesionado es marcado con éxito emitiendo fluorescencia de coloración verde amarilla, si se presenta ausencia de fluorescencia es indicativo de células con acrosoma intacto (Cross, et al., 1986).

13.11.1. Evaluación de la estabilidad de la membrana plasmática

La membrana plasmática pasa por grandes modificación para que ocurra la fecundación (Colenbrander et al., 2002).

La capacitación espermática es un proceso por el cual el espermatozoide adquiere capacidad fecundante, lo que fisiológicamente ocurre durante el paso por el trato reproductivo de la hembra. (Visconti & Kopf 1998., citado en Gadella, 2014).

De esta manera la capacitación del espermatozoide de mamíferos esta asociada con la reorganización de la membrana plasmática debido a la

remoción del colesterol y redistribución de sus fosfolípidos (Hallap, Nagy, Jaakma, Johannisson, Rodriguez- Martinez, 2006).

La sonda lipofílica Merocianina 540 puede ser empleada para monitorear el nivel de desorden en los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana plasmática aumentando la intensidad de su fluorescencia con el aumento del desorden.

Estudios de laboratorio afirman que este colorante es comúnmente adicionado al colorante yoduro de propideo para el análisis simultáneo de la integridad de la membrana plasmática. Esto porque, el Yo-Pro-1 es un colorante específico para DNA, impermeable a la membrana íntegra, y con excitación y emisión de fluorescencia semejante a la de la merocianina 540 (en torno de 540 nm) (Colenbrander et al., 2002; Hallap et al., 2006).

De esta forma, el objetivo es determinar el volumen de semen bovino usado en la selección por gradiente de percoll que resulte en una mayor concentración y motilidad espermática final, evaluando también características importantes que interfieren en la capacidad de los espermatozoides para conseguir la fecundación ovocitaria, entre las que destacan los análisis de concentración y motilidad en CASA, integridad del acrosoma, integridad de la cromatina, integridad de la membrana plasmática.

14. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en los laboratorios de fecundación *in vitro* clonación y transgéncia animal y en el laboratorio de andrología, ambos en las dependencias del Departamento de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo, campus Sao Paulo – Brasil.

14.1. Diseño experimental

Para el experimento se utilizó semen congelado de 21 Toros Nelore.

Por cada rodaje de percoll se utilizaron 3 pajillas 1,5 ml en promedio dispuestos en tratamientos (V1: 100µl de semen. V2: 200µl de semen. V3: 300µl de semen. V4: 400µl de semen). Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con el comité de Bioética de esta institución (protocolo nº 2710/2012).

14.2. Reactivos y soluciones

Todos los reactivos químicos y soluciones utilizados en este experimento son de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A), caso contrario el fabricante está indicado en la secuencia.

15. PROCEDIMIENTO

15.1. Obtención de material biológico

La técnica del uso del percoll® se basa en la capacidad de movimiento de los espermatozoides para atravesar medios de diferentes densidades. El proceso se inició con la descongelación del semen a 37°C por 30 segundos en descongelador electrónico de semen fertilize® . Posterior a ello se secaron las pajillas, 3 pajillas de un mismo toro.

Se adicionó los tratamientos V1, V2, V3 y V4 utilizando tubos *ependorf* previamente dispuestos con 400µl de percoll® 45% y 400µl de percoll® 90% temperados a 37°C, después de ello se centrifugó a 9000 g por 5 minutos obteniendo un pellet en el fondo del tubo.

El pellet es pipeteado en un volumen estándar (150µl). Estos 150µl de cada tubo son dispuestos para ser lavados, se lavaron a 9000 g por 3 minutos en 1 ml de medio FIV (Parrish; Susko-Parrish, Winer & First, 1988).

Se obtuvieron 150µl de cada pellet, utilizados para evaluar los parámetros espermáticos en: microscopio, equipo CASA y citómetro.

15.2. Análisis espermáticos

15.2.1. Motilidad espermática visual:

Los porcentajes de espermatozoides con capacidad de movimiento progresivo se clasificaron en escalas de 0 a 100%, y el vigor el cual representa la fuerza de propulsión del espermatozoide, será clasificado de 0 a 5, siendo 0

sin movimiento alguno y 5 con movimiento vigoroso. Estos análisis se realizaron en microscopio óptico de luz, en aumento de 200X, con porta y cubre objetos templados a 37°C, usando gotas de 10µl de la muestra (Figura 13).



Figura 13: Evaluación de motilidad espermática en microscopía invertida.
Fuente: Murillo, 2016.

15.2.2. Concentración espermática visual:

El número de espermatozoides se cuantificó en cámara de Neubauer, contando el cuadrante del centro de la cámara; de los 25 cuadrados pertenecientes a este cuadrante, los 4 de los extremos y el del centro fueron contados, utilizando microscopio óptico de luz, en diferentes aumentos colocando el cubre objetos sobre la cámara y adicionando 5µl de la muestra dispuestos en una solución 1: 20, 1µl de muestra por 20 de agua (Figura14).



Figura 14: Cámara de Neubauer para evaluar concentración espermática.
Fuente: Murillo, 2016.

15.3. Parámetros espermáticos.

El análisis computarizado se realizó en el sistema Computer Assisted Sperma Analysis. Casa; IVOS, v 12,2, Hamilton Thorn Research, Beverly, MA. del Laboratorio de Andrología del Departamento de Reproducción Animal de la USP.

Para ello se tomaron 5µl de cada muestra a temperatura a 37°C, utilizando 6 campos seleccionados para lectura.

Los parámetros a considerar fueron:

Motilidad total y progresiva, porcentaje de células con movimiento rápido, medio lento o estático, ALH (amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza), VCL (velocidad curvo-lineal), VSL (Velocidad lineal), BCF (Frecuencia de batida cruzada), Velocidad media en curso.

15.4. Citometría de flujo:

La citometría se realizó con ayuda del Citómetro de Flujo Guava EasyCyteTM Mini System (Guava® Technologies, Hayward, CA, E.U.A.). Este equipo utilizó un laser de argón (488nm) para la lectura de células y/o organelas (Figura 15).

Se evaluaron un total de 20.000 eventos por muestra, determinando los datos referentes a a los canales de fluorescencia amarilla (583 nm), roja (680 nm) y verde (525 nm).



Figura 15: Evaluación de diferentes tratamientos Percoll por citometría de flujo.
Fuente: Fernández, 2016.

15.4.1. Potencial de membrana mitocondrial:

El potencial de membrana mitocondrial fue detectado por la sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaninechloride). Este monómero emite fluorescencia verde en el caso de mitocondria con alto potencial de membrana, roja en el

caso de medio y bajo potencial. Para el análisis se va ajustar un número de células espermáticas estándar 10.000 por medición en medio FIV completando el volumen de la suspensión con PBS (Parrish, et al., 1988), incubadas por 10 minutos a 37° C, protegido de la luz.

Como control positivo para análisis de los datos se utilizó el protocolo descrito por Celeghini et al., 2007, con algunas modificaciones. Una muestra de semen fue sometida 10 veces a descongelación y congelación en nitrógeno líquido, para rompimiento de las membrana celulares. Como control negativo se utilizó una muestra con lo descrito al inicio del párrafo anterior.

15.4.2. Evaluación de la estructura de la cromatina

El análisis de la susceptibilidad de la estructura de la cromatina a la desnaturalización ácida se realizó en base a los protocolos descritos por Everson et al. (2002) modificado por Simões et al. (2013), utilizando el colorante fluorescente Naranja de Acridina, un colorante metacromático de DNA que permitió la evaluación del DNA en citometría de flujo. La presencia de la coloración verde indica presencia de DNA doble cadena lo que refleja que la cromatina no fue desnaturalizada, sin embargo si la coloración es roja designa la presencia de ADN de cadena simple, que indica desnaturalización de la estructura de la cromatina.

El procedimiento se realizó en sala oscura, siendo adicionadas 300.000 células en 50 µL de tampon TNE, además de 100 µL de detergente ácido. Después de 30 segundos fueron adicionados 300 µL de solución de Naranja de Acrimina siendo las muestras evaluadas después de 3-5 minutos. Las lecturas fueron realizadas en citómetro de flujo Guava EasyCyteTM Mini System

(Guava Technologies) del Departamento de Reproducción Animal de la Faculdade de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidade de São Paulo.

15.4.3. Evaluación de la membrana plasmática y acrosomal

Las sondas yoduro de propideo (PI (0,5% mg/ml, 0,9% NaCl v/v) y psium sativum conjugadas al fluoroforo isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA 100 µg/mL, ácida sódica 10% m/v, PBS q.s.p. 20 mL) fueron adicionadas en la misma muestra seminal obteniendo así los resultados combinados entre integridad de la membrana plasmática y acrosomal, de las mismas poblaciones celulares, conforme a lo descrito por Celeghini, et al. (2007) adaptado para citometría de flujo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Arruda, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epiufluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- Austin, C. R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Science Research*. 4. 581 – 596.
- Barend, M., Gadella., Luna C. (2014). Cell biology functional dynamics of the mammalian sperm. *Theriogenology*. 81. 74–84.
- Beker-van Woudenberg, A. R., Zeinstra, E. C., Roelen, B. A. J., Colenbrander, B., Bevers, M. M. (2006). Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. *Animal Reproduction Science*. 92. 231-240.
- Brogliatti, G. M., Adams, G. P. (1996) Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*. 45. 1163-1176.
- Caixeta, E. S., Machado, M. F., Ripamonte, P., Price, C., Buratini, J. (2013). Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 25. 890-899.

- Castro, L. S. (2014). *Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário*. (Tesis de maestría, Universidade de São Paulo). Recuperado de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-16032015-102623/es.php>
- Celeghini, E. C. C., Arruda, R. P., Andrade, A. F. C., Nascimento, J., Raphael, C. F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *reprod. domest. anim.* 42. 479-488.
- Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, et al (2006). Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production in vitro. *Theriogenology*. 66. 1185–93.
- Choi, Y. H., Carnevale, E. M., Seidel G. E., Squires, E. L. (2000). Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*. 56. 661-670.
- Colenbrander, B., Brouwers, J. F. H. M., Neild, D. M., Stout, T. A. E., Da Silva, P., Gadella, B. M. (2002). Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*. 58. 341-345.
- Connell, M. O., McClure, N., Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*. 17. 704–709.

- Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W., Hanson, F. W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*. 15. 213–226.
- De Roover, R., Genicot, G., Leonard, S., Bols, P., Dessy, F. (2005). Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science*. 86. 13-25.
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*. 42. 437-442.
- Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., Foote, R. H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*. 49. 871-879.
- Gadella, B. M., Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*. 81. 74-84.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G. (2000). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55. 1341-1357.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., ...Lazzari, G (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59. 599-616.

- Garcia, J. M., Avelino, K. B., Vantini, R. (2004). Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. *in*: simpósio internacional de reprodução animal aplicada, 1, 2004, londrina. São Paulo: biblioteca da Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da usp, p. 223- 230.
- Garner, D. I., Thomas, A. C., Joerg, H. W., Dejarnette, J. M., Marshall, C. E. (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 57.1401-1406.
- Gilchrist, R. B. (2011). Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. 23. 23-31.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodriguez- Martinez, H. (2006). Usefulness of a triple fluorochrome combination merocyanine 540/yo-pro 1/hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen- thawed spermatozoa from estonian holstein ai bulls. *Theriogenology*. 65. 1122–1136.
- Hasler, j. f., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., Mccauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, I. S., Stokes, J. E., Trimmer, S. A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine ivf embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43. 141 – 152.
- Hazeleger, N.L.; Stubbings, R. B. Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. *Theriogenology*, v. 37, n. 1, p. 219, 1992.

Henkel RR, Schill WB (2003). Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:108.

International Embryo Technology Society (IETS, 2014)

<http://www.iets.org/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true>

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2013).

<http://www.ica.gov.co/Noticias/Pecuaria/2013.aspx>

Kussano, N. R., Lemme, L. O., Guimarães, A. L. S., Franco, M. M., Dode, M. A. N. (2016). Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Thereogenology* 85. 1-10.

Lee, H. L., Kim, S. H., Ji, D. B., Kim, Y. J. (2013). A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *Journal of Veterinary Science.* 10. 249-255.

Leibfried-Rutledge, M. L., Critserl, E. S., Parrish, J. S., First, N. L. (1989). In vitro maturation and fertiliation of bovine oocytes. *Thereogenology.* 31. 61-74.

Lonergan, P., Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *The Annual Review of Animal Biosciences.* 4. 10.1-10.12.

Machado, G. M., Carvalho, J. O., Filho, E. S., Caixeta, E. S., Franco, M. M., Rumpf, R., Dode, M. A. (2009). Effect of Percoll volume, duration and force of

centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. 71. 1289 - 97.

Machaty, Z., Peippo, J., Peter, A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*. 78. 937-950.

Manik, R. S., Singla, S. K., Palta, P. (2003). Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. *Animal Reproduction Science*. 76. 155–161

Merton, J. S., De Roos, A. P. W., Mullaart, E., De Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. A. M., Dieleman, S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59. 651-674.

Nedambale, T. L., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinsky, J. R., Tian, X. C., Yang, X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 62. 437-449.

Noguchi, M., Yoshioka, K., Hikono, H., Iwagami, G., Suzuki, C., & Kikuchi, K. (2013). Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen–thawed boar sperm. *Zygote*. 10. 1 - 8.

- Oliveira, L. Z., Hossepian de Lima, V. F.M., Levenhagen, M. A., Dos Santos, R. M., Assumpção, T.I., Jacomini, J. O., ...Beletti, M.E. (2011). Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa. *Journal of Veterinary Science*. 12. 267-272.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO,2013).<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>
- Õura, C., Toshimori, K. (1990). Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *International Review of Cytology*. 122. 105–151. *Animal Reproduction Science*. 107. 229-236.
- Oshio, S. (1988). Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. *Gamete Research*. 20. 159-164.
- Peixer, M. A. S., Rumpf, R., De Bem, A. R., Quiroz, I. M. V. (1997) Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas. in: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.
- Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruij, T. A. M. Taverne, m.a.m. (1987). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30. 751 – 762.
- Parrish, J. J. (2013). Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 81. 67-73.

- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. Winer, M. A., First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperma by heparin. *38*. 1171 – 1180.
- Park, J. J., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Journal of Veterinary Science*. *303*. 682–684
- Pontes, J. H. F., Melo Sterza, F. A., Basso, A. C., Ferreira, C. R., Sanches, B. V., Rubin, K. C. P., Seneda, M. M. (2011). Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale comercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. *75*. 1640-1646.
- Qui, M., Yao, Y., Ma, H., Wang, J., Zhao, X., Liu, L., Tang, X., Zgang, L., Sun, F. (2013). Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle. *Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering*. *18*. 1-3.
- Renzi, A. (2012). *Análise da influência do hormônio anti-Mülleriano na produção in vitro de embriões bovinos*. (Tesis de doctorado). Recuperado de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-19042013-154338/es.php>
- Rhemrev, J., Jeyendran, R. S., Vermeiden, J. P., Zaneveld, L. J. (1989). Human sperm selection by glass wool filtration and two- layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril*. *51*:685–690.

- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Espey, L. L. (2002). Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual Review of Physiology*, 64. 69- 92.
- Sutton, M. L., Cetica, P. D., Beconi, M. T., Kind, K. L., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G. (2003). Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*. 126. 27-3
- Simões, R., Feitosa, W. B., Siqueira, A. F., Nichi, M., Paula-Lopes, F. F., Marques, M. G., ...Assumpção, M. E. O. (2013). Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*. 146(5). 433–41.
- Takagi, M., Kim, I. H., Izadyar, F., Hyttel, P., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Hendriksen, P. J., Vos, P. I. (2001) Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction*. 121. 941 – 951.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Oclin, K.(2002). Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57. 149-179.
- Vaccari, S., Weeks II, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti, M. (2009). Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 81. 595-604.

Wang, Y., Kong, N., Li, N., Hao, X., Wei, K., Xiang, X., ...Zhang, M. (2013). Epidermal growth factor receptor signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and meiotic resumption in mouse oocytes. *Endocrinology*. 10,1210. 2013-1133.

Yang, X., Jiang, S., Foote, R. H. (1993). Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Molecular reproduction and development*. 34. 94 – 100.

ANEXOS

Anexo A: Medio para diluir

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Concentración
Medio 199	Gibco	31100-035	-
NaHCO₃	Sigma	S-8875	2,2 % (m/v)
Agua milli-Q	-	-	1L

pH 7,2

Filtrar a 0,22

Anexo B: soluciones stock y medios para FIV

Solución stock para FIV

Reactivo	Fabricante	Catalogo	TALP STOCK	TALP SEMEN
NaCl	Sigma	S-5886	0,01 M	0,01 M
KCl	Sigma	P-5405	0,003 M	0,003 M
MgCl₂	Sigma	M-2398	0,5 uM	0,4 mM
NaH₂PO₄	Sigma	S-0876	0,35 uM	0,3 mM
NaHCO₃	Sigma	S-8875	0,025 M	0,025 M
CaCl₂H₂O	Sigma	C-5670	0,003 M	0,003 M
Ác. Lactico syr.	Sigma	L-7900	0,15% (v/v)	0,3% (v/v)
Hepes	Sigma	H-0891	*****	0,01 M

pH=7,4

Filtrar en 0,22 um

Solución de gentamicina

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Concentración
Sulfato de gentamicina	Sigma	G-1264	50 ug/ml
Solución fisiológica	-	-	100ml
Alicotar y mantener a -20° C			

Solución de piruvato

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Concentración
Ácido pirúvico	Sigma	P-3662	0,02 M
Agua destilada	-	-	10 ml
Alicotar y mantener a -20° C			

Componentes de la solución PHE

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Concentración
Penicilamina	Sigma	P-40-3	0,3 mg/ml salina 0,9%
Hipotaurina	Sigma	H-1384	0,109 mg/ml salina 0,9%
Epinefrina	Sigma	21,930-4	0,04575 mg/ml sol. pH 4,0

Solución de PHE

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Volumen
Penicilamina	Sigma	P-40-3	2,5 ml
Hipotaurina	Sigma	H-1384	2,5 ml
Epinefrina	Sigma	21,930-4	2 ml
Solución salina			4 ml

Solución PBS-PVP

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Volumen
PBS 10mM			10 mM
Polivinilpirrolidona (PVP)	Sigma	P-0930	1% (m/v)

Anexo C: Soluciones para sondas fluorescentes

FITC-PSA

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Concentración
FITC-PSA	Sigma	L0770	100 ug/ml
Acido Sódico	Fisher	BP9221-500	10% (m/v)
DPBS	-	-	20 ml

Yoduro de propidio

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Concentración
Yoduro de propidio	Sigma	P4170	0,5 mg/ml
NaCl	Fisher	S5886	0,9% (v/v)

JC-1

Reactivo	Fabricante	Catalogo	Concentración
JC-1	Molecular Probes	T2168	76,5 uM
	Sigma	D2650	-

Anexo C: soluciones para procedimientos de MIV

MATURAÇÃO

MEIO DE RASTRAMENTO MIV

	5 ml	10 ml	20 ml	30 ml
TCM-199 com HEPES	4,95 ml	9,9 ml	19,8 ml	29,7 ml
SFB 1%	50 µl	100 µl	200 µl	300 µl
Piruvato 0,2 mM	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl
Gentamicina	25 µl	50 µl	100 µl	150 µl

Filtrar em 0,22 µm
Colocar FECHADO na estufa

MEIO DE LAVAGEM MIV

	5 ml	10 ml	20 ml	30 ml
TCM-199 com HEPES	4,5 ml	9 ml	18 ml	27 ml
SFB 10%	0,5 ml	1 ml	2 ml	3 ml
Piruvato 0,2 mM	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl
Gentamicina	25 µl	50 µl	100 µl	150 µl

Filtrar em 0,22 µm
Colocar FECHADO na estufa

MEIO MIV

	5 ml	10 ml
TCM-199 com BICARBONATO	4,5 ml	9 ml
SFB 10%	0,5 ml	1 ml
Piruvato	10 µl	20 µl
Gentamicina	25 µl	50 µl
FSH	5 µl	10 µl
LH	50 µl	100 µl
Filtrar em 0,22 µm		
Estradiol	5 µl	10 µl

Colocar ABERTO meia rosca na estufa

Fuente: Murillo, 2016.

Anexo D: soluciones para procedimientos FIV

FIV GOTA				
	1.920 µl	3.840 µl	5.760 µl	= 7.680 = 20 9.1
MEIO FIV	1.820 µl	3.640 µl	5.460 µl	
Heparina	20 µl	40 µl	60 µl	
PHE	80 µl	160 µl	240 µl	Proteger da luz

100 µl
400 µl

Filtrar em 0,22 µm
Colocar ABERTO meia rosca na estufa

PERCOLL Mini (400 µl)		
	90%	45 %
NaHCO ₃ (Sigma S-5761)	0,0021 g	Diluir 300 µl de Percoll 90% em 300 µl de TL-Sêmen
Percoll	900 µl	
Solução 10x	100 µl	
CaCl ₂ 2H ₂ O 1M	2 µl	
MgCl ₂ 6H ₂ O 0,1 M	3,9 µl	
Ácido láctico (lactato de sódio)	3,7 µl	

*Esta receita é para montar 1 gradiente de percoll

Para 2 gradientes: dobrar a receita do percoll 90% e diluir 700 µl de 90% em 700 µl de 45%.

→ receita antiga!

Hoje 90% percoll 90
10% sol. 10X (já tem todos os outros ingredientes)
* pipetar bem antes de pipetar

TALP SÊMEN (TL-SÊMEN)

Fuente: Murillo, 2016.

FECUNDAÇÃO

MEIO DE LAVAGEM PRÉ-FIV

	10 ml	15 ml	20 ml
BSA - V (Sigma A-9647)	0,030 g	0,045 g	0,060 g
TCM-199 com HEPES	10 ml	15 ml	20 ml
Piruvato	20 μ l	30 μ l	40 μ l
Gentamicina	50 μ l	75 μ l	100 μ l

Filtrar em 0,22 μ m
Colocar FECHADO na estufa

MEIO - FIV

	5 ml	10 ml	6 ml
BSA - Livre de ácidos graxos (Sigma A-6003)	0,030 g	0,060 g	0,036 g
TL - STOCK	5 ml	10 ml	6 ml
Piruvato	10 μ l	20 μ l	12 μ l
Gentamicina	25 μ l	50 μ l	30 μ l

6ml K50M
0,0180g BSA
1,5 μ l Genta
80 μ l Amn. Essenc.
120 μ l Amn. Essenc.

Anexo E: Medio para cultivo de embriones KSOM

Componente	Concentración (mM)
NaCl	95.00
KCl	2.50
KH ₂ PO ₄	0.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
NaHCO ₃	25.00
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.71
D-Glucose	0.20
Sodium Lactate	10.00
Sodium Pyruvate	0.20
EDTA	0.01
L-Glutamine	1.00
BSA	1.0 (g/l)
Sodium Penicillin G	100.0 (u/ml)
Streptomycin	0,05 (g/l)
Phenol Red	0.00
HEPES	0.00

Anexo F: Aminoácidos esenciales y no esenciales para enriquecimiento del medio KSOM



Fuente: Murillo, 2016

Anexo G: Distintos reactivos para composición de medios



Fuente: Murillo, 2016.