



Protocolo de Fertilización *in vitro*

modificado del protocolo del laboratorio de P. J. Hansen

<http://www.animal.ufl.edu/hansen/IVF/default.htm>

Adriana Fernandez

Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela

Preparación de Medios

Transporte de los Ovarios:

Se prepara 0.9% de solución salina (0.9 g de NaCl por litro de agua bidestilada y se lleva al autoclave) y se puede almacenar indefinidamente a 4°C.

Medio de Recolección de Ovocitos (OCM)

Se disuelve el TCM 199 (sin rojo fenol y sin glutamina) en 10 L y 3.50 g de NaHCO₃ en 9 L de Agua Bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2-7.4 y se lleva a un volumen de 10 L. La solución se filtra y se colocan 400 ml en botellas de 500 ml. Se pueden mantener indefinidamente a 4°C. Se etiquetan los frascos, colocando la fecha, persona que la prepara y se le coloca (OCM-supplements). Se almacena en la nevera y dura una semana.

Cuando se van a trabajar los ovarios este medio se suplementa con:

1 alícuota de BSS+heparina (Stock 4)

1 alícuota de glutamina 4 ml (Stock 11)

1 alícuota de Pen/strep 4 ml (Stock 15)

Se le cambia la etiqueta y se coloca suplementada (OCM+Supplements)

Medio de Maduración de Ovocitos (OMM)

Se preparan frascos con 87 ml de TCM 199 y se almacenan a 4°C

La noche antes de utilizarlo, se suplementa con lo siguiente:

10 ml de BSS 10 ml (Stock 3)

1 ml de gentamicina (Stock 8)

25 µl de Folltropin (Stock 6)

200 µl de estradiol (Stock 5)

1 ml de Piruvato de NA (Stock 2)

1 ml de glutamina (Stock 10)

Se guarda en la nevera y se usa en una semana. No se filtra.

Preparación del medio de fertilización y Preparación del semen.

Debe prepararse temprano en la mañana o en la tarde del día anterior.

El medio TALP (Caisson media), se prepara de la siguiente manera

Ingrediente	Sperm TALP (sp-TL)	HEPES-TALP	IVF-TALP
TL (ml)	76	500	100
BSA (factorV) g	0.480	1.5	0
BSA EFAF (g)	0	0	0.6
Pyruvato (ml)	4.0	5.0	1.0
Gentamicina (µl)	160	750	100
Heparina (µl)	0	0	500

Una vez preparado cada uno de los medios se filtran, se etiquetan y se utilizan en una semana.

Preparación del medio de cultivo de los embriones (KSOM-BE)

Al igual que los otros medios, este hay que prepararlo por lo menos 3 horas antes de transferir los ovocitos/embriones.

En un tubo de 15 ml se colocan 5 ml de KSOM, se suplementa con 0.150 g (15 mg) de albúmina libre de grasa (EFAF; hay que pesarla en el momento que se va a utilizar). Se le agrega 25 µl de MEM (aminoácidos no esenciales) y 2.5 µl de gentamicina. Se mezcla en el tubo sin usar el vortex y se filtra en un filtro de 0.22 µm en otro tubito estéril. Se debe usar inmediatamente.

Se procede a preparar las placas de petri (60 x 15) gotas de 50 µl y se recubren con aceite mineral. Se llevan a la incubadora. Se colocan 30 embriones por gota.

Preparación del medio 10X SP-TL (se utiliza para preparar el Percoll)

En 100 ml de agua (Sigma) se agrega lo siguiente:

4.675 g de NaCl

0.23 g de KCL

0.40 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$

2.38 g de Hepes

Se ajusta el pH a 7.3, se filtra y se guarda indefinidamente a 4°C.

Protocolo de Fertilización *in vitro*

Lavado de los ovarios

Una vez que llegan los ovarios al Lab, se lavan bien con la solución de transporte (debe estar en la estufa), se cambia la solución y permanecen a temperatura ambiente hasta que se van a trabajar.

Recolección de los ovocitos

Temprano en la mañana o la tarde anterior se preparan las placas de maduración (placas de Petri redondas) 1 o 2 dependiendo del número de ovocitos a recolectar. Se preparan gotas de 50 μ l, se cubren con aceite mineral y se lleva a la incubadora con 5% de CO₂ a 38,5°C (se colocan 10 ovocitos por gota). Se identifica placas con iniciales y fecha.

Procedimiento:

Se tienen los ovarios en temperatura ambiente hasta que se comienzan a trabajar con guantes de latex. Luego se seleccionan los ovarios con bastantes folículos y se desechan aquellos con cuerpos luteos muy grandes y quistes. Los ovarios a utilizar se colocan en un frasco limpio con el mismo medio de transporte (Solución Salina).

Se lleva a la campana, un Beaker con aproximadamente 100 ml de OCM. Se toman los ovarios con la pinza por todo el borde se quita el exceso de grasa y se comienzan a cortar cada uno de los ovocitos con el bisturí (hoja # 11), dos o tres cortes y lateral también. Una vez terminado de masajear el ovario se mueve bien dentro del medio, dándole vueltas en el frasco y luego los escurre. Este procedimiento debe hacerse rápido.

Antes de filtrar los ovocitos, se coloca el Beaker en baño de María mientras se prepara lo demás.

Debe desinfectarse todo antes de trabajar con etanol al 70%, se saca una placa de búsqueda y se coloca encima de la platina calentadora, también se coloca una placa GRID con OCM en los cuatro well. Sacar la pipeta de transferencia (Dummond), desinfectar la punta con etanol y colocarle la punta. Así mismo sacar el filtro separador de células y la pinza para agarrarlo y se coloca sobre otro beaker pequeño. También se coloca medio

(que debe estar en la estufa) en un Beaker pequeño para limpiar el filtro. Preparar lupa.

Una vez tasajeado el ovario, se coloca el medio con los ovocitos en 2-3 tubos cónicos de 50 ml y se dejan reposar 5-10 min. Luego se extrae desde el fondo el pellets con una Pasteur y se va colocando sobre el filtro. Esto se puede repetir 5 a 6 veces de cada tubo cónico. Inmediatamente se lava el filtro encima de la placa de búsqueda (con un poquito de OCM) con una inyectora de 12 ml y una aguja 18. Se lava bien el filtro por todos los bordes. Si hace falta más medio se le agrega a la placa. Luego se comienzan a buscar los ovocitos y con la pipeta Dummond se van transfiriendo a uno de los well. Se comienzan a seleccionar y se van lavando en los otros well del plato Grid. Ya se pueden empezar a agrupar de diez en diez para facilitar el trabajo. Se deben seleccionar ovocitos bien rodeados con células del cumulus con citoplasma homogéneo mas bien oscuro. Zona pelúcida intacta. No seleccionar ovocitos expandidos, ni desnudos.

Una vez terminado los lavados, sacar la placa de maduración de la incubadora y transferir los ovocitos lo más rápido que se pueda y colocar 10 ovocitos por gota de medio. Llevar a maduración en la incubadora, durante 20-24 horas.

Preparación de las placas de Fertilización y preparación del semen

Por lo menos debe realizarse 2 o 3 horas antes de la fertilización. Entonces en la mañana temprano del segundo día (o sea día 0, porque es cuando se va a fertilizar). Todo se realiza dentro de la Campana de Flujo Laminar, previamente desinfectada con etanol al 70%.

Se suplementa el medio de IVF-TALP. (Frasco de 100 ml nuevo; Caisson). Lo que está en el congelador debe descongelarse).

1. Se pesa 0.6 g de BSA-EFAF, se agrega al frasco de IVF-TALP y se mezcla muy suavemente.
2. Se agrega 1 ml de Piruvato (Stock 2) (debe estar en la nevera forrado con papel aluminio).
3. Se agregan 100 µl de gentamicina (Stock 8). (debe estar congelado).
4. Se agregan 500 µl de heparina (Stock 7). (Debe estar congelado). Mientras se deja disolver bien el medio, se procede a preparar los tubos cónicos.
5. Se filtra el medio de IVF-TALP a través de un filtro milipore 0.22 µl en otro frasco estéril.

6. Se llenan completamente 4 tubos cónicos de 15 ml con Hepes TALP (HepesTL) se tapan y se llevan a la estufa.
7. Se agregan 10 ml en un tubo cónico de 15 ml de Hepes TALP. Se tapa y se lleva a la estufa. Se coloca Wash en la etiqueta.
8. Se agregan 5 ml de IVF-TALP a un tubo cónico de 15 ml y se pone la tapa pero no se cierra y se lleva a la incubadora.
9. Se preparan las placas de fertilización de 4 well, según el número de ovocitos que se están madurando, agregando 600 μ l de IVF-TALP, calculando mas o menos 30 ovocitos por well y se lleva a la incubadora. No se coloca aceite mineral y se identifican las placas con iniciales y fecha.
10. Luego se prepara el percoll:
 - Se agrega a un tubo cónico de 15 ml, 1.5 ml de Percoll al 90% y 1.5 ml de Sperm-TALP. O sea este sería el Percoll al 45%. Se mezcla en el vortex (una sola vez).
 - Se agrega a un tubo cónico de 15 ml, 3 ml de percoll al 90%
 - Se pone a calentar el agua donde se va a descongelar el semen. 37-38°C.

Procedimiento:

Pasada dos o tres horas y calculando las 20 a 24 horas de maduración de los ovocitos, se procede a preparar el semen de la siguiente manera:

Con una pipeta Pasteur plástica se coloca muy lentamente y en el fondo del tubo del percoll al 45%, el 90% del percoll, sin perturbar el medio. Se debe ver el menisco de separación entre el percoll al 90% abajo y el percoll al 45% arriba. Se lleva cuidadosamente a la estufa. También se puede ser al revés, colocar el Percoll al 45% a través de las paredes sobre el Percoll al 90%.

Se saca del congelador el eppendorf que contiene el Stock de penicilina, hipotaurina y epinefrina (PHE) y se cubre con papel de aluminio y se coloca en la estufa, así mismo, se colocan los container de la centrífuga y las pipetas Pasteur plásticas. Se prepara microscopio para evaluar el semen. Por otro lado se coloca una servilleta en el mesón y se coloca encima la tijera y para empujar el semen, se coloca otra servilleta encima y se le pone etanol. Se prepara una placa Grid con HepesTL que está en la estufa y se llenan 2 de los 4 well. Se coloca sobre la platina calentadora; así mismo se prepara la pipeta de transferencia que en este caso es una inyectora de tuberculina con el acoplador en la punta. Y una punta amarilla.

Es importante donde se va a trabajar el semen que haya un calentador, para evitar el shock de frío a los espermatozoides.

Luego se sacan 3 pajuelas de semen de toros diferentes, se descongelan por 60 seg y se seca bien la pajuela. Se corta y se empuja el semen sobre el Percoll que estaba en la estufa con mucho cuidado. El semen debe colocarse sin perturbar el medio, encima del gradiente de 45%. Se colocan las tres pajuelas sobre el percoll y se coloca en el container de la centrífuga que debe haber estado en la estufa. Se centrifuga a 1000 x g (2.5) por 10 min.

Mientras se esperan los diez minutos, se pueden sacar las placas con los ovocitos maduros y se transfieren a la placa Grid que está encima de la platina calentadora y se lavan en los diferentes wells (normalmente se hacen los grupos de 30 y se lavan una sola vez), tratando de hacer ya los grupos de 30 ovocitos para facilitar y agilizar la transferencia. Una vez lavados los ovocitos, se saca la placa de fertilización y se transfieren con la Dummond o con la inyectora de tuberculina 30 ovocitos por well. Se vuelve a llevar la placa para la incubadora.

Una vez terminado los 10 min de centrifugación, se extrae el pellet con una Pasteur que está en la incubadora y se coloca en el tubo que contiene Sperm-TL. Debe traerse de tomar únicamente el pellet porque el Percoll es tóxico para los espermatozoides. No debe perturbarse el medio. Se coloca en otro container de la estufa y se lleva a centrifugación a 200 x g (1.5) por 5 min. Se bota el excedente, sin perturbar el medio y se toma únicamente el pellet. Si se mezcla el medio hay que centrifugar de nuevo. Este procedimiento debe realizarse rápido porque los espermatozoides comienzan a moverse del pellet. A esto le agregamos el medio IVF-TL que teníamos en la incubadora (se utiliza lo que cargue mas o menos la Pastur). Se pipetea muy suavemente los espermatozoides. De aquí se toma una muestra y se observa al microscopio. Se ve la motilidad individual de los espermatozoides sin usar laminilla. Mientras tanto el semen se deja en la estufa.

Posteriormente, se sacan las placas de fertilización de la incubadora y se colocan sobre la platina calentadora. Se le agrega 25 μ l de semen por well (tomar la dosis de la mitad de la suspensión) y 25 μ l de PHE que estaba en la estufa. Se lleva la placa a la incubadora de 18 a 20 horas.

Otra manera de preparar el semen si no se tiene Percoll es la siguiente:

Se descongelan las pajuelas y se colocan en un tubo con 10 ml de HEPES TL y se centrifuga a 1.5 durante 5 min. Se extrae el pellet y se coloca en otro tubo con 10 ml de HEPES TL y se vuelve a centrifugar a la misma velocidad por 5 min más. Luego se extrae el excedente con la pipeta Pastur y se deja

únicamente el pellet. Luego se le agrega el medio IVF-TL que está en la incubadora lentamente a través de las paredes y se evalúa. Se agregan igual 25 μ l a cada well de la placa de fertilización. En este caso la muestra queda con más detritus y entonces cuando se van a cambiar los presuntos embriones al medio de cultivo se deben lavar 4 o 5 veces antes de transferirlos al medio de cultivo.

Preparación Cultivo de los Embriones

Se coloca en la platina calentadora una placa Grid y se agrega como 5 ml de Hepes-TL a 3 de los 4 Wells. También se coloca un Beaker pequeño con Hepes-TL. Se saca el tubito eppendorf con la hialuronidasa del congelador y se coloca en la estufa. Una vez descongelada, le agrego con una micropipeta 1 ml de Hepes-TL que estaba en la estufa, se mezcla bien y se coloca sobre la platina calentadora dentro de una gomita para sostenerla. Se saca la placa de fertilización de la incubadora y se transfieren los ovocitos fertilizados con la pipeta Dummond al tubito eppendorf. Lo dejo por un ratito y extraigo el excedente del medio y dejo nada más la parte final del tubito donde se encuentran los embriones. Luego lo llevo al vortex durante 5 min, poniendolo y quitandolo encima del vortex para agitarlos mejor. Luego se le agrega con una Pasteur plástica (estufa), Hepes-TL y se lava bien el tubito, incluyendo la tapa y se va colocando en la placa Grid en el Well que no tenía medio. Luego lavo bien los embriones agrupandolos en grupos de 30, en cada well de la placa Grid. Lavarlos dos o tres veces. Luego saco la placa de cultivo y transfiero los embriones 30 por well a la placa de cultivo que estaba en la incubadora 2 o 3 horas antes del mencionado procedimiento.

Se evalúa el porcentaje de divisiones a los tres días y porcentaje de blastocitos a los 8 días.