

## VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS EN PAJILLA ABIERTA

L. Bonilla, J. Block, and P. J. Hansen

*Dept. of Animal Sciences, University of Florida and Ovatech LLC*

Este protocolo es una adaptación del protocolo de Gabor Vajta.

### MEDIOS:

- **Medio Base (MB):** TCM-199 w/ y rojo fenol (Cellgro) + 10% Suero Fetal Bovino (SFB) + 5 ml/ml Gentamicina;
- **Medio Sacarosa MS:** 1M Sacarosa (Fisher S-5) disolver en MB;
- **Etilenglicol EG:** [Sigma Aldrich](#) (102466);
- **Dimetilsulfoxido DMSO:** [Sigma Aldrich](#) (D2650);

### PLACA DE PREPARACIÓN:

- **VITRIFICACIÓN:** Añadir a una placa de cuatro pozos las siguientes soluciones:
  - Pozo 1: **MB** 800 ml
  - Pozo 2: **MB** 800 ml
  - Pozo 3: **MB** 850 ml, **EG** 75 ml, **DMSO** 75 ml (VS1)
  - Pozo 4: **MS** 670 ml, **EG** 165, **DMSO** 165 ml (VS2)
  - Mezclar la solución 3 y 4 utilizando un pipeteador
- **DESCONGELAR:** Añadir a una placa de cuatro pocillos las siguientes soluciones:
  - Pozo 1: **MB** 800 ml, **MS** 400 ml
  - Pozo 2: **MB** 800 ml, **MS** 400 ml
  - Pozo 3: **MB** 800 ml, **MS** 200 ml
  - Pozo 4: **MB** 800 ml,
  - Mezclar la solución 1 y 3 utilizando un pipeteador
- **PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACIÓN:**
  - Cubrir la placa y calentar por 5 o 10 minutos
  - Colocar los embriones en el pozo 1, transferirlos con la menor cantidad de aceite mineral que los cubre en los pozos de cultivo.

- Después de aproximadamente 1 minuto, transferir los embriones al pozo 2, este pozo se utiliza de almacenamiento mientras se vitrifican los embriones paso a paso.
- Coloque una gota de 20 ml en el centro de una placa de 4 pozos (4DW), hacia el lado derecho y parte inferior de la placa de 4DW (ver fig. 1).
- Transferir de 1 a 10 embriones en el pozo 3, con un mínimo volumen de medio por 3 minutos.
- Transferir los embriones en el menor volumen posible a la gota de 20 ml. Aspirando y expulsando tomar el embrión en aproximadamente 2 ml de volumen, hacer una pequeña gota a la izquierda del centro e inferior de la placa 4DW. Después de eso toca el lado izquierdo de la gota con la OPS, por el extremo final en un ángulo aproximado de 70 grados horizontal a la parte inferior, un cilindro de VS2 de aproximadamente 1mm que contiene los embriones debe estar formado, completar este paso en 25 segundos.
- Sumergir la pajilla en nitrógeno líquido en un movimiento que pase rápido por el vapor, la pajilla debe permanecer casi horizontal, entonces mover a vertical.
- Almacenar por largo tiempo, se sugiere almacenar OPS dentro de pajillas de 0.5 ml etiquetando y cerrando la pajilla.
- Después de 2 o 3 ciclos de vitrificación hacer otra gota de 20 ml de medio.

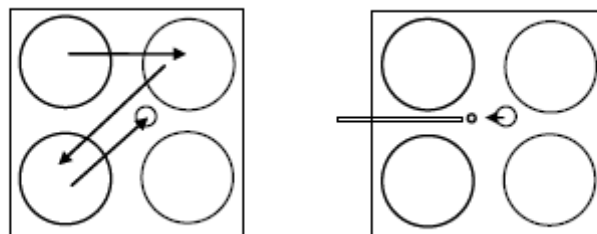


Fig. 01

- **PROCEDIMIENTO DESCONGELACIÓN:**
  - Coloque uno de los 4 pozos de la placa en el microscopio (lámpara).
  - Sacar la pajilla del nitrógeno líquido sostener con los dedos pulgar, índice y medio.
  - En 5 segundos sumergir la pajilla en el pozo visto al microscopio en un ángulo de 30 a 45 grados (relación horizontal), pero sumerja el total la columna de líquido vitrificado conteniendo el (los) embrión (es).
  - Inmediatamente después que la columna de solución vitrificada se derrite, el medio del pozo comienza entrar a la pajilla. En este momento, cerrar el extremo

abierto de la pajilla con el dedo índice, posteriormente dejar salir la solución antes vitrificada de la pajilla.

- En raras ocasiones queda un remanente de solución en la pajilla, en este caso se adaptara un pipeteador al extremo abierto para vaciarla.
  - Inmediatamente después transferir los embriones al pozo 2, (se realiza la transferencia semi-directa, el (los) embrión (es) se carga (n) en la (s) pajilla (s) en este momento, otra manera será seguir los dos pasos siguientes).
  - Después de 5 minutos, transferir los embriones al pozo 3 luego de otros 5 minutos cambiarlos al pozo 4.
  - Colocar los embriones en el plato apropiado para continuar cultivo.
- **PROCEDIMIENTO DESCONGELACIÓN transferencia semi - directa:**
- Este procedimiento requiere que solo un embrión se haya vitificado en pajilla abierta
  - Repetir el procedimiento descrito anteriormente descongelar y transferir embriones en pozo 2.
  - Inmediatamente después, cargar el embrión en pajilla de .22 cc utilizando el medio del pozo 2 y realizar la transferencia (ver **TE protocolo de transferencia de embriones**).
  - La transferencia debe realizarse no más de 5 minutos de descongelados los embriones.

Modificado 11 de abril 2011 Traducido junio 22 2011 Luis A. Dávila F.