

# Protocolo para la Producción de Embriones *In Vitro*

## Preparación de Medios

### I. Medio de Transporte de Ovarios

Solución salina 9% (9 g. de NaCl en 1.000 mL de agua destilada). La solución debe de estar a 38,5 C. Agregar 25 mg amphoterecin-B, 10.000U PenG y 10.000mg Streptomycin.

Colectar los ovarios directamente de la carcasa, remover los tejidos con ayuda de una tijera y colocarlos en el termo. Transportarlos al laboratorio lavarlos con solución salina temperada y mantenerlos en solución salina temperada hasta su uso.

### II. Medio de Lavado (ML)

SOF-Hepes Solución Stock	10 mL
L-Glutamina-stock	100 µl
Piruvato Stock	30 µl
Gentamicina (SIGMA)	10 µl
Aminoácidos esenciales (SIGMA)	200 µl
Aminoácidos no esenciales (SIGMA)	100 µl
BSA	30 mg

Filtrar (0,02 µm) y mantener congelado por un máximo de 2 semanas en alícuotas de 1,5 mL aproximadamente. Antes de su uso incubar a 38,5 C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% Hd por lo menos 2 horas.

### III. Medio de Maduración (MM)

Medium 199 (SIGMA)	9 mL
FCS (SIGMA)	1 mL
FSH-LH stock	10 µl
Piruvato stock	20 µl
Gentamicina	10 µl

Filtrar (0,02 µm) y guardar congelado por un máximo de 1 mes en alícuotas de 1,5 mL aproximadamente. Antes de su uso agregar FSH-LH stock (5 µl) y piruvato (2,5 µl) por cada 500 µl de medio. Antes de su uso preparar gotas de 40 µl cubrir con aceite mineral e incubar a 38,5 C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% Hd por lo menos 1 hora.

### IV. Medio de Fertilización (MF)

TL-stock	10 mL
BSA	0.06 g
Piruvato stock	20 µl
Gentamicina	10 µl

Filtrar (0,02 µm) y guardar congelado por un máximo de 2 semanas en alícuotas de 1,5 mL aproximadamente. Antes de su uso preparar gotas de 40 µl cubrir con aceite mineral e incubar a 38,5 C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% Hd por lo menos 1 hora.

### V. Selección de Espermatozoides (Método Percoll)

<b>Percoll 90%</b>	
Percoll (SIGMA)	9 mL
PBS 10X o PBS X	1 mL
Ácido lactico	30 µl
CO <sub>3</sub> NaH	25,5 mg

<b>Percoll 45%</b>	
Percoll 90%	1 mL
TL-stock	1 mL

<b>Percoll 22.5%</b>	
Percoll 45%	1 mL
TL-stock	1 mL

La gradiente de Percoll que se uso fue de 45/22,5. En un tubo de 15 mL agregar 2 mL de Percoll 22,5 y con ayuda de una jeringa añadir desde la base del tubo de 15 mL el Percoll 45. Dejar a 37 C por lo menos 30 minutos. Agregar una pajilla de semen lentamente en la superficie de la gradiente. Centrifugar por 30 minutos a 2.000 RPM. Luego remover el líquido y dejar el pellet y agregarle 30 mL de TL-stock y diluir lentamente. Usar 3 a 5 µl de la solución en el medio de fertilización.

### VI. Medio de Cultivo (MC)

SOF-Hepes Solución stock	9 mL
L-Glutamina-stock	100 µl
Piruvato stock	30 µl
Gentamicina	10 µl
Aminoácidos esenciales	200 µl
Aminoácidos no esenciales	100 µl
FCS	500 µl
Glucosa	2,6 mg

Filtrar (0,02 µm) y mantener congelado por un máximo de 2 semanas en alícuotas de 1 a 5 mL aproximadamente. Antes de su uso preparar gotas de 40 mL cubrir con aceite mineral e incubar a 38,5 C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% Hd por lo menos 1 hora.

### Preparación de Stocks

#### I. SOF-Stock

NaCl	314,5 mg
KCl	26,5 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 mg
NaHCO <sub>3</sub>	105 mg
Rojo Fenol	1 mg
Ácido Láctico	20 µl
CaCl <sub>2</sub> -stock	1 mL
MgCl <sub>2</sub> -stock	1 mL

Enrasar a 50 mL con agua destilada autoclavada. Ajustar el pH a 7,45. Filtrar (0,02 µm). Almacenar a 4 C por un periodo máximo de 2 semanas.

## II. SOF-HEPES Solución Stock

SOF-Stock	50 mL
HEPES (SIGMA)	119 mg

Ajustar el pH a 7,45. Filtrar (0,02 µm). Almacenar a 4 C por un periodo máximo de 2 semanas.

## III. TL-Stock

NaCl	333 mg
KCl	11,5 mg
NaHCO <sub>3</sub>	105 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mg
Rojo Fenol	1 mg
Ácido Láctico	33 µl
CaCl <sub>2</sub> -Stock	1.19 mL
MgCl <sub>2</sub> -stock	1 mL

Ajustar el pH a 7,45. Filtrar (0,02 µm). Almacenar por un máximo de 2 semanas a 4 C.

## IV. CaCl<sub>2</sub>-Stock

Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O	125,7 mg
Agua destilada autoclavada	10 mL

Separar en alícuotas de 1 mL y congelar. Al descongelar la alícuota, esta puede permanecer a 4 C por 2 semanas.

## V. MgCl<sub>2</sub>-Stock

Cl <sub>2</sub> Mg.6H <sub>2</sub> O	49.8 mg
Agua destilada autoclavada	10 mL

Separar en alícuotas de 1 mL y congelar. Al descongelar la alícuota, esta puede permanecer a 4 C por 2 semanas.

## VI. Heparina-Stock

TL-stock	1 mL
Heparina	1 mg

Separar en alícuotas 100 µl y congelar. Al descongelar la alícuota, esta puede permanecer a 4 C por 1 semana.

## VII. FSH-LH-Stock

FSH (Folltropin-V)	0,5 mg
LH (SIGMA)	0,5 mg

Medium 199	1 mL
------------	------

Separar en alícuotas de 20 µl y congelar. Al descongelar la alícuota no volver a congelar y descartar.

## VIII. L-Glutamina Stock

L-Glutamina (SIGMA)	14 mg
Solución salina	1 mL

Separar en alícuotas de 100 µl y congelar. Al descongelar la alícuota no volver a congelar y descartar.

## IX. Aceite Mineral

Solución salina	150 mL
Aceite Mineral (Daniel HE)	350 mL

Agitar la mezcla y dejarlo en la incubadora indefinidamente. Al sacar el aceite mineral e introducirlo a la cámara de flujo laminar y/o incubadora desinfectar la botella con alcohol.

## X. PBS (10X)

### Solución A

ClNa	8 g
ClK	0,2 g
Cl <sub>2</sub> Mg.6H <sub>2</sub> O	0,1 g
Cl <sub>2</sub> Ca	0,1 g
Glucosa	1 g
Na-Piruvato (SIGMA)	0,036 g

sFiltrar (0,02 µm). Enrasar a 100 mL y guardar a 4 C.

### Solución B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g

Filtrar (0,02 µm). Enrasar a 100 mL y guardar a 4 C.

## XI. PBS (X)

Solución A	1	mL
Solución B	1	mL
Agua Destilada	8	mL

## XII. Na-Piruvato Stock

Na-Piruvato	11	mg
Medium 199	1	mL

Conservar congelado en alícuotas de 250 µl. Descartar después de usar, no volverlo a congelar.

Las sales fueron adquiridas de MATHESON, COLEMAN & BELL DIV. La calibración del pH se realizó con NaOH 1N.