

**DIA -1**  
**RECUPERACION DE OVARIOS**  
**COLECCION Y MADURACION DE OVOCITOS (CCOs)**

[Recolección de Ovarios](#)

[Recuperación de Ovocitos](#)

[Preparación de](#)

[Medios Día 0](#)

[Ir a Día -2](#)

[Ir a Día 0](#)

[Ir a Día 1 - 9](#)

[Página Principal](#)

**COLECTA DE OVARIOS:**  
**Materiales y equipo necesario**

[Soluciones](#)

[Preparación de Medios](#)

[Suplementos](#)

Para la recolección se deposita en un termo 2 contenedores con 0.5 litros de solución salina + penicilina/estreptomicina.

Vestimenta según los requisitos del matadero (incluir botas de hule)

Bisturí y Tijeras

Guantes

**Procedimiento**

- 1.- Remover los ovarios del aparato reproductor de las vacas, inmediatamente después que son extraídos los órganos internos de la canal y depositar los ovarios en los contenedores.
- 2.- Al coleccionar los ovarios se les quita el exceso de grasa, tejido y sangre, masajeándolos (frotándolos) en el contenedor, inmediatamente después colocarlos en los contenedores y estos en los termos.
- 3.- Transportar los ovarios al laboratorio de inmediato.

**Recolección de Ovocitos (CCOs)**  
**Material y Equipo Necesario**

[Soluciones](#)

[Preparación de Medios](#)

[Suplementos](#)

❖ **Preparación de Microgotas**

- Incubadora (5% CO<sub>2</sub>, a 38.5° C)
- Cámara de flujo laminar
- Pipeteador de 100 microlitros y puntas para Pipeteador
- Medio de Maduración de Cuerpo Cúmulo Ovocitos (OMM) + Suplemento
- Aceite mineral
- Placa Falcón de 60 X15 (Platos Petri)
- Pipetas Pasteur Plásticas

- 1 botella de Medio de Recolección de CCOs (OCM 400 ml)+ suplemento pre calentado a 38.5°C
- 1 Litro de Solución Salina + Penicilina/Estreptomicina pre calentado a 38.5°C

#### ❖ Preparación para Colectar los CCOs

- Bisturí
- Placa Petri con micro gotas de OMM + suplementos, inmersas en aceite vegetal y pre equilibradas x cuando menos dos horas antes a 38.5°C y 5% de CO<sub>2</sub>
- Papel para cubrir la superficie de la mesa en la campana de flujo laminar
- Placa X
- Placa Petri cuadriculada (Grid)
- Filtro Celular Falcón de 100 micras
- Tubos de 50 ml para centrifuga, con tapa de cierre hermético
- Hojas de Bisturí de # 11 y # 20
- Guantes
- Vaso volumétrico 400 ml/estéril
- Contenedor p/desechar ovarios
- Laminilla térmica 38.5°C
- Microscopio de disección
- Estufa de baño maría a 38.5°C
- Pipetas de transferencia estériles
- Jeringuilla estéril de 10 ml
- Agujas calibre 18
- Vaso volumétrico de 50 ml



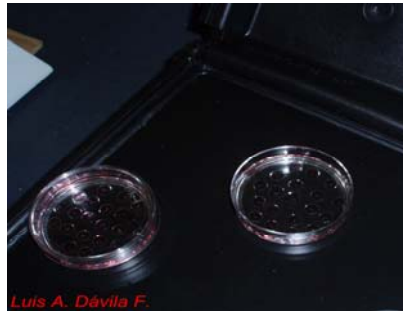
**Figura 2.-** Placas de cultivo necesarios para FIV, sobre Laminilla Térmica a 38.5°C de izq. a der. Placa Petri Falcón 60 X15 que se usara para preparar las microgotas, Placa nunclon con 4 Wells (depósitos ó compartimentos) para Fertilización, Placa (Grid) de búsqueda y colección de CCOs, Placa X para lavar y clasificar los Ovocitos (CCOs {Complejos Cumulus Ovocitos}) y Embriones, todos los contenedores y placas deberán estar listos y estériles, a 38.5°C sobre la platina térmica. Pueden ser comprados en [Fisher Científica](#).

## PROCEDIMIENTO

1.- Colocar una botella de 1 litro, de solución salina + el suplemento (OCM + suplemento) 4 horas antes de que lleguen los ovarios al laboratorio, en la estufa a 38.5° C.

Cuando la persona que trae los ovarios al laboratorio llegue deberán estar preparados los Medios para lavar los ovarios, Medio de recolección y las Microgotas de Maduración. Se deberá tener suplementado el Medio de Maduración de Ovocitos, una hora antes de la expectativa de llegada de los ovarios.

2.- 2 horas antes tener lo necesario, Preparados los platos de 60 X 15 conteniendo las microgotas de 50 micro litros (Figura. 3) de OMM cubiertas de aceite mineral, preparar cuantas gotas se estime necesario considerando colocar solo 10 ovocitos por gota.



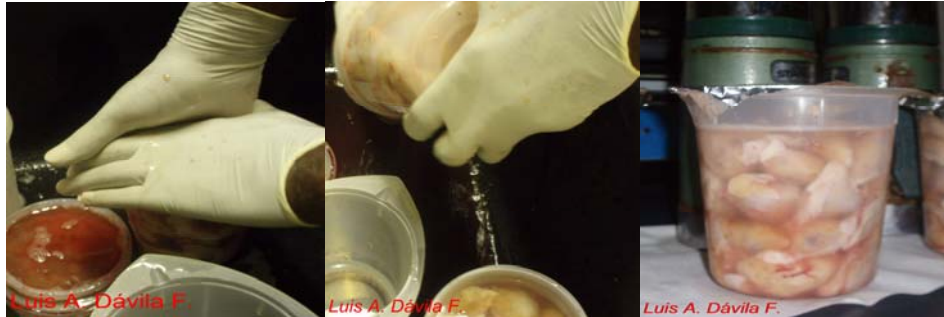
**Figura 3.-** Preparación de micro gotas serán de 9 - 50 micro litros en placa falcón de 60 X 15, completadas las gotas cubrirlas con aceite mineral, efectuar todo el proceso con pipeta estéril.



**Figura 4.-** Para la colección de los CCOs es necesario tener 2 contenedores de 1 litro (de plástico), uno para contener los ovarios antes de ser procesados y otro para depositarlos luego de extraídos los ovocitos, 1 Vaso volumétrico de cristal grueso de 400 mililitros con 100 mililitros de OCM + suplementos (medio de recolección de ovocitos {CCOs}), tener pinzas de hemostasia para sujetar los ovarios, bisturí con navajas suficientes y papel para cubrir la mesa de trabajo dentro de la cámara de flujo laminar.

3.- Llegando los ovarios al laboratorio, lavarlos con un masaje severo hasta que la solución salina tornada rojiza x la sangre se aclare con dos o tres cambios de esta

(la solución salina deberá estar precalentada a 38.5° C, lo que será mejor para quitar la sangre a los ovarios), enseguida de lavarlos se colocan en un contenedor plástico de 1 litro. Que contenga solución salina a 38.5° C (mientras dura la colección de los CCOs).



**Figura 5.-** Masajee los ovarios para remover la sangre.

4.- Adicionar el medio de recolección de CCOs al vaso volumétrico de 400 ml, de la botella que lo contiene.

5.- Sujetar los ovarios por la base con una pinza de hemostasia firmemente, se debe diseccionar el exceso de tejido y grasa de la base sujeta del ovario luego limpiarlo en el papel que cubre la base de la cámara, incidir los folículos con el bisturí en 2 y 3 milímetros en sentido vertical, luego repetir la operación en sentido horizontal, por todo la ancho y largo del ovario (como se muestra en la Figura 6).

Recibir el fluido folicular y sangre en el medio de colección (OCM), no coleccionar los folículos de 10 milímetros o más (no incidirlos) ni seccionar los cuerpos lúteos por que tienen mucha sangre, es imperativo efectuar el procedimiento correctamente para tener resultados satisfactorios (no incidir folículos de 10 y mas milímetros ni cuerpos lúteos).



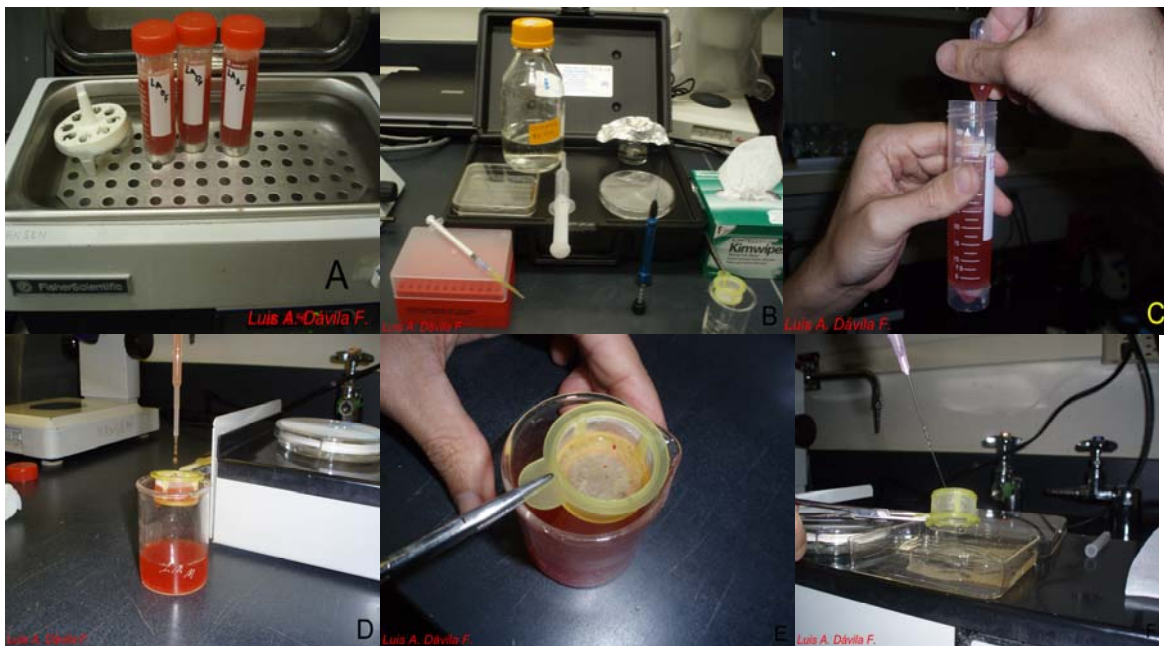
**Figura 6.-** Diseccionar los ovarios, para que los CCOs sean liberados y poder coleccionarlos. **A)** sujeción de los ovarios por su base con una pinza de hemostasia, **B)** remoción del exceso de tejido y grasa del ovario, **C** y **D** incisiones en el ovario dentro del vaso volumétrico de 400 mililitros, con incisiones de 2 y 3 milímetros hechas en ambas direcciones, vertical y horizontal rápidamente y cortas, con movimientos firmes comprimiendo los folículos.

6.- Sumergir los ovarios dentro del OCM y agitar vigorosamente, para que el ovario suelte los CCOs, repetir el proceso para cada ovario, (después de agitar presionar

en las paredes del vaso volumétrico) y exprimir (figura 7). Un vaso volumétrico anticipa un resultado de 10 ovocitos por cada ovario trabajado, algunas veces se obtienen hasta 20 o 30 de cada uno.



**Figura 7.-** Recolectando los CCOs de cada ovario foto lado izquierdo, agitando el ovario en el OCM, en la foto derecha, el ovario es presionado en una pared del vaso volumétrico para que drene los CCOs en el OCM.



**Figura 8.-** Lavados y preparación de los ovocitos recolectados anteriormente de los ovarios, foto **A)** descriptiva de los tubos cónicos de precipitado donde fue depositado el OCM, conteniendo los CCOs, reposado por 5 minutos en una estufa de baño maría a 38.5<sup>o</sup> C, foto **B)** Los suplementos necesarios para los siguientes pasos, fotos **C) D)** Aspiración de los CCOs, mostrando la técnica de aspiración y colocación en el filtro celular, foto **E)** Quitando el excedente de medio, para luego integrarlos a la placa de búsqueda foto **F).**

7.- después de la recolección de los CCOs el medio conteniéndolos, se coloca en tubos cónicos de 50 mililitros de centrifuga esterilizados, dependiendo de los que

se requiera para ello, procurando no llenar más de 45 mililitros por tubo para poder maniobrar posteriormente sin derramar

Nota: se utilizaran los tubos que se requieran dependiendo del medio que contenga el Vaso volumétrico de 400 ml donde fueron diseccionados y lavados los ovarios.

8.- Coloque los tubos conteniendo los CCOs y medio de recolección en baño maría (38° C) por mínimo 5 minutos para que precipiten los CCOs, (**Figura 8 A**).

9.- Mientras los CCOs se asientan (precipitan) se coloca OCM en un vaso volumétrico pequeño 100 ml se llena una jeringa de 10 ml que servirá para lavar el filtro celular sobre la placa de Petri, donde serán recibidos los CCOS que fueron filtrados, la placa contendrá antes 2 ml de medio precalentado que será donde se reciba el filtrado, y el lavado de filtro con jeringuilla, (CCOS y OCM precalentado en la estufilla e incubadora a 38.5° C) (**figura 8 F**)

10.- Use pinzas fórceps para sujetar el filtro celular de 100 micras y colóquelo sobre un vaso volumétrico esterilizado de 100 ml, usando una pipeta Pasteur plástica esterilizada, aspirar el pellet de CCOs del fondo del tubo cónico de centrifuga que los contienen. (**Figura 8C**), lentamente depositar lo aspirado dentro del filtro celular (**Figura 8D**), tres tubos de medio conteniendo los CCOs deberán ser filtrados en cada proceso. Nota, tener precaución de no atascar o derramar el separador (filtro celular), enjuagar el filtro con OCM y lavar.

11.- Inmediatamente regrese el filtro y con la jeringuilla de 10 ml (con aguja de No. 18) conteniendo el OCM riegue la base del filtro y las paredes con el invertido (**Figura 8F**), sobre la placa que contendrá OCM precalentado (Figura 9) en la platina térmica para la localización.

Nota: si es necesario procesar más de 3 tubos de ovocitos, el tamiz del filtro celular puede ser reutilizado después de terminar el paso 11.

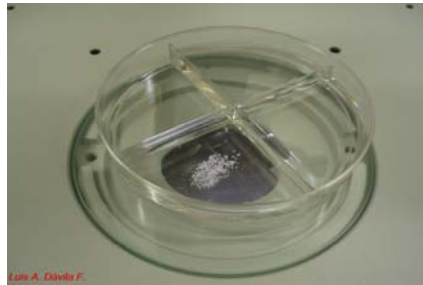
Nota. Este es un protocolo alternativo disponible, para procesar ovarios y obtener CCOs, esto no compromete el uso del filtro celular. Este es el protocolo original para ser usado.



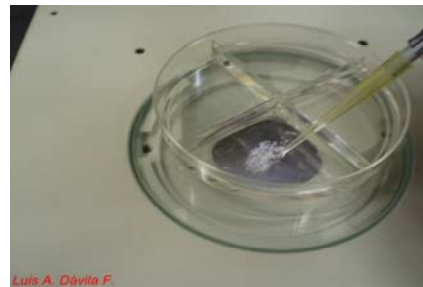
**Figura 9.-** Recolección de Ovocitos, antes los CCOs fueron filtrados, el contenido total de la placa donde se integraron será revisado y examinado al microscopio. Utilizando el manipulador que prefiera al técnico, (drummond, jeringuilla, etc.).

12.- Recolectar los Complejos Cúmulos Ovocitos (CCOs) tan rápido como sea posible para prevenir los adversos efectos del shock térmico (frio) solo los CCOs que tienen cúmulos completo y compacto en la célula y el citoplasma granuloso con la zona prelucida bien marcada, sin espacios limpios deberán usarse para ser colectados y ser utilizados en los pasos subsecuentes, este procedimiento se efectúa en las placas X que contienen OCM (Figura 10). Continúe lavando y transfiriendo los CCOs en cada compartimento de la placa X, Utilizando el instrumento que mejor le adapte, Pipeteador wiretrol, drumond, jeringuilla, etc. (Figura 11).

13.- Transferir los CCOs a cada compartimento de la placa X dejando atrás los desechos, procurar en cada paso llevarlos lo más limpios posible, repetir la operación, después de lavar por dos o tres veces los CCOs deben quedar sin despojos. (Figura 10).



**Figura 10.-** Plato X usado para lavar los CCOs) Pueden ser comprados en **Fisher científica**.



**Figura 11.-** Lavado de CCOs utilizando una placa X.



**Figura 12.-** Utensilios necesarios para la manipulación de los CCOs y presuntos Cigotos de Izq. a Der 1) Jeringuilla de 1.0 c c estéril (de las utilizadas para tuberculina o insulínica), conectada por un adaptador a una **punta de Pipeteador (200 microlitros)**. 2) Manipulador Drummond 3) Manipulador Wiretrol y 4) Capilares de 5 microlitros drummond (pueden comprarse en **Fisher Científica**.) Para la selección y manipulación de CCOs y presuntos cigotos. Para instrucciones de instrumentos y manipulación. **Presione aquí**.

14.- Para ser transferidos los CCOs tienen que estar lavados y sin despojos, luego transferirlos a las microgotas de 10 a 50 microlitros de OMM (Medio de Maduración de Ovocitos) (Fig. 13) **Nota. Es esencial que los CCOs sean colectados, bien lavados y con el menor medio posible colocarlos en las microgotas, e inmediatamente después en la incubadora de maduración, así es posible obtener un máximo desarrollo.**



**Figura 13.-** transfiriendo los CCOs a microgotas de Maduración

15.-Incubar por 18 – 24 horas a 38.5° C y 5% CO<sub>2</sub>

---

## PREPARACION DE MEDIOS PARA DIA 0

1.- Medios para utilizar el mismo día, Los medios siguientes se deben preparar el día -1 de modo que estén listos para el día siguiente (día 0).

HEPES - TL y HEPES - TALP  
IFV –TL y IVF TALP  
Sp – TL Y Sp – Talp  
90% Percoll

2. Las instrucciones para preparar medios están disponibles en página de **preparación de medios**.

---

El material original de esta página web pertenece © Rocio Rivera, [Peter J. Hansen](#) et al. 2000-2002, Traducido Mayo 2007 por Luis A. Dávila Las ligas a los sitios comerciales no constituyen el endoso de los Autores o la Universidad de Florida.

