

PROTOCOLO ABREVIADO PRODUCCION DE EMBRIONES IN VITRO

Esta lista de comprobación se puede utilizar para asegurarse de que cada paso en el procedimiento de IVP está terminado con éxito.

DÍA - 2

Preparación de Medios

Solución Salina
Medio de Recolección (OCM)
Medio de Maduración (OMM)

Comprobar las incubadoras para saber si hay exactitud en temperatura y lecturas de CO₂

DÍA -1

Colección de Ovarios del Matadero

Preparación Colección de CCOs

Colocar OCM complementado en estufa
Preparar las placas de los microgotas de Medio de Maduración y cubrirlos con aceite mineral
Colocar las placas en la incubadora
Preparar la colección de CCOs

- Bisturí
- Navajas para bisturí
- Guantes
- Vaso volumétrico de 400 ml
- Contenedor plástico para desechar ovarios
- Papel para cubrir la superficie de la Cámara de Flujo Laminar

Cosecha de Complejo Cúmulos Ovocitos de Ovarios

- Agregar 100 ml de OCM al vaso volumétrico
- Diseccionar Ovarios
- Agitar los ovarios en el vaso volumétrico
- Verter OCM y la mezcla del CCOs en los tubos de centrifugadora estériles de 50 ml y colocarlos en baño de agua a 38.5°C

Colección de Complejo Cúmulos Ovocitos (COCs) de los Tubos de Centrifugadora (5 Min. de tiempo de la sedimentación)

- Preparar la colección de CCOs
- Filtro Celular (tamiz) de 100 micras
- Pipetas de transferencia estériles
- jeringuilla plástica estéril de 10 ml
- aguja de numero 18 estéril
- Placa de búsqueda cuadrículada (placa grid de búsqueda)
- Colocar el filtro celular sobre el vaso volumétrico de 50 ml
- Con una pipeta de transferencia, aspirar el pellet de CCOs y colocar en filtro celular
- Mover en un movimiento rápido y con precaución el filtro celular encima de la placa de búsqueda colocada sobre la platina calentadora
- con la jeringuilla llena de OCM enjuagar el contenido del filtro celular sobre placa (grid) de búsqueda

Búsqueda de Complejo Cúmulos Ovocitos

- Placa X
- Microscopio de disección
- Instrumento manipulador (microdispensor, wiretrol, etc.)
- Laminilla térmica
- Transferir los complejos cúmulo ovocitos a la placa X y lavar dos veces transfiriendo al siguiente well cada ves

Maduración de Ovocitos

- Después lavados o enjuagados los complejos cúmulo ovocitos transferir a gotas de maduración (10/gota) en microgotas de 50 microlitros de OMM pre equilibrado cubierto de aceite mineral
- Complejos cúmulos ovocitos estarán maduros en 18-24 h (colocar placa de maduración en la parte posterior de la incubadora)

Preparar los medios para la fertilización

- HEPES-TALP
- IVF-TALP
- Esperma-TALP
- 90% Percoll

DÍA 0

Preparación de los Medios para Fertilización (2.5 h antes de la fertilización)

- Gradiente de Percoll (apretar la tapa y colocarlo en horno caliente 38.5°C)
3 ml el 45% (1: 1dilución Esperma-TL- Percoll) sobre este 3 ml el 90% (crear el gradiente)
- HEPES-TALP (apretar la tapa y colocarlo en horno caliente)
- 3 tubos de centrifugadora con 15 ml HEPES-TALP

- IVF-TALP (tapa colocada sobre el tubo sin cerrar y a 38.5°C en CO2 al 5%)

Placas wel IVF - TALP (600 ml/well)

1 tubo de centrifugadora con 3.5 ml IVF-TALP

SP-TALP (tapa bien cerrada y colocarlo en horno caliente)

1 tubo de centrifugadora con SP-TALP de 10 ml

- PHE (colocada en el horno)

- Contenedores metálicos de centrifugadora pre calentados (colocados en el horno)

- Enchufar el termo des congelador de semen

Preparar la Madurados de Cuerpo Cumulo Ovocitos: Disposición para Lavar y Fertilización

-Placa-X con HEPES-TALP

- Instrumento manipulador

- Microscopio de disección

- Calentador

- Tijera

- Émbolo para expeler el semen

- Microscopio invertido

- Placa de Petri pequeña

- Estante para los tubos (colocar delante del calentador)

- Platina calentadora

- Pipeta Pasteur estéril de plástico

- Pipeteador (25 ml)

- Punta para pipeteador

Maduración de CCOs lavado y fertilización

- Transferencia 3 grupos de 10 complejos cúmulo ovocitos de la placa de OMM a una esquina de una Placa X que contiene HEPES-TALP. Repetir la operación hasta tener todos los CCOs en la placa X.

- Transferir los grupos de 30 complejos madurados del cúmulo ovocitos a cada uno de los 4 pozos de la placa de fertilización IVF-TALP pre equilibrado. Poner las placas detrás en la incubadora.

Preparación del esperma (trabajar delante del calentador)

- Colocar 1-3 pajillas de semen en descongelador (termo).

- depositar el semen usando el embolo, encima del gradiente de Percoll.

- Colocar el tubo de Percoll en un contenedor de centrifugadora pre-calentado.

- Centrifugar por 10 minutos a 1000 x g.

- Recoger el pellet de semen con una pipeta Pasteur.
- Colocar el pellet en el tubo que contiene 10 ml de SP-TALP.
- Colocar el tubo SP-TALP en un contenedor de centrifugadora. Pre-calentado
- Centrifugar por 5 minutos en 200 x g.
- Pipetear el supe nadante sobre el pellet.
- Agregar IVF-TALP y determinar la concentración (Hemacitómetro).

Fertilización

- Agregar 25 microlitros de mezcla de semen a cada pozo que contiene CCOs.
- Agregar 25 microlitros de PHE a cada uno.
- Colocar las placas 4 well (pozos) detrás en la incubadora y permitir que la fertilización proceda por 8-10 h (colocar atrás las placas permite evitar los cambios de temperatura por la frecuente apertura de puerta de la incubadora).

Medios de Cultivo

- KSOM (modificado)
- Preparar las placas con microgotas de 50 microlitros de KSOM y cubrirlas con aceite mineral
- Colocar las placas en la incubadora para equilibrar por lo menos 2 h antes de poner en ellas los cigotos Putativos (presuntos embriones) al ser retirados de las gotas de fertilización

Remoción de Embriones de Gotas de Fertilización

- Vortex
- Platina Calentadora
- Hyaluronidasa (opcional) calentar
- Tubos estériles de microcentrifuga estéril en un soporte
- Calentador frente al microscopio
- Placa X
- HEPES-TALP
- Microscopio de disección
- Instrumento Manipulador
- Contador de tiempo (cronometro)

Remoción de CCOs Fertilizados/Embriones de Gotas de Fertilización

- Al tubo de microcentrifuga conteniendo la hyaluronidasa se le agrega HEPES-TALP, 500 - 900 microlitros, para la colección de cigotos putativos (embriones).
- Transferir los CCOs fertilizados de placa de fertilización al tubo de microcentrifuga.
- Vórtice el tubo por 3-5 minutos delante del calentador.
- Transferir el contenido del tubo de microcentrifuga a la placa X con una pipeta Pasteur estéril (enjuagar el tubo varias veces).
- Búsqueda y colección de presuntos embriones libres de cúmulos.
- Enjuagar 2 veces transfiriendo de well en placa X en HEPES-TALP.

- Transferencia de presuntos embriones en grupos de hasta 30 a las microgotas de KSOM.
- Colocar la placa de cultura en la parte posterior de la incubadora.

DÍA 3

- Pre-calentar el microscopio y el cuarto
- Determinar la división celular (ser rápido)

DÍA 5 (OPCIONAL)

- Colocar el tubo de FBS (Suero Fetal Bovino) en la incubadora para 1-2 h antes de uso
- Pre-caliente el lugar
- Agregar 5 microlitros de FBS por cada embrión que contiene la microgota (opcional)

DÍA 7-9

- Pre-caliente el microscopio y el lugar (cuarto)
- Evaluación y anotación del desarrollo de blastocistos

Página Principal

Esta página se actualizo 05-10-05, el material original de esta página pertenece a © [Rocio Rivera](#), [Peter J. Hansen](#) et al. 2000-2002, y se tradujo en Mayo 2007 por Luis A. Dávila F. Las ligas comerciales no constituyen un endoso de los Autores o la Universidad de Florida

