



*Red Latinoamericana  
de Reproducción Asistida*

**Manual  
de procedimientos  
Laboratorio de  
Reproducción Asistida**

## **Red Latinoamericana de Reproducción Asistida**

*Este documento fue preparado por:*

- Dr. Ariel Ahumada (Chile)
- Dra. Mónica Jimenez (Colombia)
- Dra. Ana Lucia Mauri (Brasil)
- Dr. Luis Roblero (Chile)
- Dra. María Soledad Sepúlveda (Chile)

*Revisado por:*

- Dra. Alejandra Bernal (Colombia)
- Dr. Roberto Coco (Argentina)
- T.M. Teresa López (Chile)

*Santiago de Chile, Agosto, 1998.*

## **EDITORIAL**

En abril de 1997, durante el II Taller Latinoamericano de Reproducción Asistida, los biólogos y tecnólogos representantes de centros pertenecientes a la RED, iniciaron un proyecto para realizar un manual de procedimientos de laboratorio de reproducción asistida. Reunidos en la ciudad de Cozumel, México, grupos de trabajo se responsabilizaron en diseñar y desarrollar algunos contenidos de lo que sería un manual que hiciera posible describir y estandarizar procedimientos de laboratorio, criterios de clasificación de óvulos y embriones, etc. A continuación de ese primer esfuerzo, la RED reunió en Chile a un grupo de trabajo que tuvo como misión redactar este documento.

Este manual de Laboratorio esta destinado a educar a centros que se inician, y mediante la estandarización de procedimientos, hacer posible el desarrollo de estudios multicéntricos y multinacionales. Esperamos con ello, seguir contribuyendo al desarrollo de nuestra región.

En representación de todos los miembros de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Richard Rawlins, PhD., que, con espíritu de altruista y desinteresado contribuyó al inicio de esta tarea y ha destinado un enorme esfuerzo y dedicación a entrenar y capacitar científicos pertenecientes a la RED.

Dr. Fernando Zegers-Hochschild  
Director Ejecutivo  
Red Latinoamericana de Reproducción Asistida

# INDICE

- Maduración meiótica del ovocito
- Fecundación en mamíferos
- Desarrollo preimplantacional

## **I. PREPARACION DE UN LABORATORIO PARA REPRODUCCION ASISTIDA**

### **1. NORMAS DE TRABAJO PARA UN LABORATORIO DE REPRODUCCION ASISTIDA**

- A. Lavado quirúrgico de manos e indumentaria
- B. Consideraciones generales

### **2. ACONDICIONAMIENTO FISICO DE UN LABORATORIO DE REPRODUCCION ASISTIDA**

- A. Aseo del laboratorio
  - i) antes de un programa
  - ii) durante un programa
  - iii) después de un programa

### **3. OTRAS NORMAS DE TRABAJO**

### **4. CERTIFICACION DE EQUIPOS**

- A. Campana de flujo laminar
- B. Equipos ópticos y accesorios
  - (i) elementos ópticos
  - (ii) elementos mecánicos y pinturas de recubrimiento
  - (iii) accesorios
- C. Incubadoras
  - i) control de temperatura y nivel de CO<sub>2</sub>
  - ii) limpieza interna
  - iii) calibración y reemplazo de componentes

### **5. CONTROLES BIOLÓGICOS**

- A. Cultivo para hongos
  - i) control laboratorio y equipos

- ii) control de los medios de cultivo
- B. Cultivo para bacterias
  - i) control del laboratorio y equipos
  - ii) control de los medios de cultivo
- C. Control de Calidad de los Medios de Cultivo
  - i) Sobrevida espermática
  - ii) Desarrollo de embriones de ratón

## **II. PROCEDIMIENTOS DE REPRODUCCION ASISTIDA**

### **1. TIPOS DE PROCEDIMIENTO**

- A. Transferencia de gametos a la trompa (GIFT)
- B. Fecundación *in vitro* (FIV)
  - i) con transferencia embrionaria al útero (TIU)
  - ii) con transferencia embrionaria a la trompa (TET)
- C. PROST

### **2. MEDIOS DE CULTIVO**

#### **A. FORMULACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

##### Medios simples

- i) Human tubal fluid (HTF)
- ii) HTF modificado
- iii) Earle's balanced salt solution (EBSS)
- iv) iv) P1 (preimplantation stage one)

##### Medios compuestos

- i) Ham's F-10
- ii) Minimal essential medium (MEM)
- iii) Menezzo B2

#### **B. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

- i) Ham's F-10 o MEM

#### **C. MEDIOS PREPARADOS DE FABRICA**

#### **D. NUEVOS MEDIOS DE CULTIVO PARA SUSTENTAR EL DESARROLLO IN VITRO DE CONCEPTI**

#### **E. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS PARA LAS DISTINTAS ETAPAS DE UN PROCEDIMIENTO DE REPRODUCCION ASISTIDA.**

- i) aspiración

- ii) inseminación
- iii) crecimiento
- iv) transferencia

### **3. METODOS DE PREPARACION Y SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES**

#### **A. SEPARACION POR SWIM UP**

- i) Materiales
- ii) Procedimiento
- iii) Procedimiento swim up modificado

#### **B. SEPARACION POR GRADIENTES DE DENSIDAD**

- i) Materiales
- ii) Procedimiento
- iii) Procedimiento minigradientes de Percoll

### **4. RECEPCION DE OVOCITOS DURANTE ASPIRACION FOLICULAR**

- A. Materiales
- B. Procedimiento de recepción de ovocitos aspirados
- C. Clasificación de la madurez somática del complejo cúmulo-corona-ovocito

### **5. INSEMINACION**

#### **A. EN CAPSULA ABIERTA**

- i) Materiales
- ii) Procedimiento

#### **B. BAJO ACEITE MINERAL**

- i) Materiales
- ii) Procedimiento

### **6. EVALUACION DE LA FECUNDACION**

- A. Materiales
- B. Procedimiento
- C. Anormalidades de la fecundación
  - i) pronúcleo único
  - ii) poliploidía

### **7. DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL *IN VITRO***

- A. DESARROLLO EN CAPSULA ABIERTA
  - i) Materiales
  - ii) Procedimiento
- B. DESARROLLO BAJO ACEITE MINERAL
  - i) Materiales
  - ii) Procedimiento
- C. EVALUACION DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

## **8. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

- A. Materiales
- B. Procedimiento
- C. Clasificación de la Transferencia

## **III. FECUNDACION ASISTIDA: INYECCION INTRACITOPLASMATICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI).**

### **1. PREPARACION DE ESPERMATOZOIDES PARA ICSI**

- A. Materiales
- B. Procedimiento

### **2. OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DESDE BIOPSIA TESTICULAR**

### **3. PREPARACION DE LOS OVOCITOS PARA ICSI**

- A. Materiales
- B. Procedimiento

### **4. PROCEDIMIENTO DE MICROINYECCION INTRACITOPLASMATICA**

- A. Materiales
- B. Procedimiento

### **5. NUEVAS TECNICAS DE MICROMANIPULACION EN CONCEPTI HUMANOS**

- A. Hatching Asistido
- B. Remoción de Fragmentos

## **IV. CRIOPRESERVACION DE GAMETOS, CIGOTOS Y *CONCEPTI***

## **1. CRIOPRESERVACION DE ESPERMATOZOIDES**

- A. Aplicaciones de la congelación de semen
- B. Crioprotectores
- C. Técnica

## **2. CRIOPRESERVACION DE OVOCITOS**

## **3. CRIOPRESERVACION DE CELULAS EN ESTADO DE PRONUCLEO O EMBRIONES**

- A. Materiales
- B. Preparación de los medios de descongelación
- C. Protocolo de congelación y almacenamiento
- D. Protocolo de descongelación

## **4. PROTOCOLO DE CRIOPRESERVACION ULTRARAPIDO (VITRIFICACIÓN)**

- A. Materiales
  - i) Solución de Criopreservación
  - ii) Soluciones de descongelación
- B. Procedimiento
  - i) Congelación
  - ii) Descongelación

## **V. REFERENCIAS**

## **VI. PROVEEDORES**



## **MADURACIÓN MEIÓTICA DEL OVOCITO HUMANO**

En los mamíferos, los ovocitos permanecen detenidos en la profase de la primera división meiótica, hasta que la hembra experimenta la madurez sexual. Con el estímulo hormonal apropiado, el ovocito adquiere gradualmente la competencia para entrar en la etapa final de la primera división meiótica, a medida que aumenta de tamaño durante la maduración folicular. La estimulación por la hormona luteinizante (LH), ocasiona la maduración nuclear del ovocito, el que experimenta ruptura de la vesícula germinativa. Los cromosomas se ensamblan en el huso meiótico I y ocurre la primera división meiótica: un set de cromosomas homólogos rodeado por una pequeña cantidad de citoplasma es extruido como primer corpúsculo polar. En este estado cada cromosoma está compuesto por cromátidas hermanas las que no se separan hasta la anafase de la segunda división meiótica.

Figura: Meiosis en el Ovocito

La meiosis II prosigue y el ovocito entra en arresto de división, con los cromosomas alineados en la placa ecuatorial del segundo huso meiótico. En este estado el ovocito es liberado del folículo y ocurre la ovulación, en respuesta al pico de LH.

## **FECUNDACIÓN EN MAMÍFEROS**

La fecundación de un ovocito comprende una serie de eventos que ocurren en un orden cronológico y que llevan a la incorporación del material genético del espermatozoide en el citoplasma del huevo, dando origen a la formación de un cigoto.

Durante el tránsito por el tracto genital hasta las trompas de Falopio, el espermatozoide se capacita, es decir, le ocurren cambios fisiológicos y estructurales que le permiten hiperactivarse y luego experimentar la reacción acrosómica. La cabeza del espermatozoide hiperactivo se une a la zona pelúcida del ovocito (unión primaria), mediante la interacción de residuos de carbohidrato de un componente de la zona pelúcida ZP3 con moléculas ligando en la superficie del espermatozoide. Esta unión provoca la reacción acrosómica, en que se fusiona la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide, liberando el contenido acrosomal, cuyo componente principal es la serina proteasa, acrosina.

La unión primaria progresa a una unión denominada unión secundaria que corresponde a una interacción especie-específica entre otro componente de la zona pelúcida ZP2 y acrosina. Mediante la acción proteásica de acrosina el espermatozoide se suelta y vuelve a interactuar con la zona pelúcida, penetrándola luego de ciclos alternados de unión y lisis. El espermatozoide

alcanza así el espacio perivitelino, toma contacto con la membrana plasmática del ovocito y la cola cesa de batir. Se fusiona la membrana plasmática postacrosomal con la membrana plasmática del ovocito, incorporándose el espermatozoide al citoplasma.

La fecundación induce la reacción cortical en el ovocito, que a su vez provoca la reacción de zona. La reacción cortical consiste en la liberación del contenido enzimático de los gránulos corticales por fusión de la membrana plasmática del ovocito con la membrana de los gránulos. La difusión de este contenido a través de la zona provoca cambios estructurales que impiden la unión de nuevos espermatozoides.

La fecundación activa el ovocito que se encontraba detenido en la metafase de la segunda división meiótica. Se completa esta división eliminándose el segundo cuerpo polar. El material genético haploide del ovocito y del espermatozoide se rodea de membrana nuclear, constituyendo los pronúcleos femenino y masculino, que migran hacia el centro de la célula. Durante esta migración ocurre duplicación del DNA. Las membranas de los pronúcleos se rompen (singamia) y los cromosomas se ensamblan en el huso mitótico, para dar lugar al primer clivaje del nuevo individuo.

## **DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL**

Se define como desarrollo preimplantacional el periodo comprendido entre la formación del cigoto y la implantación del blastocisto en el endometrio (figura 2). En el humano dura entre 6 y 7 días, durante los cuales migra desde la porción ampular de la trompa hasta el útero. Durante este periodo el *conceptus* experimenta una serie de divisiones celulares sin experimentar crecimiento y finalmente se forma el blastocisto que contiene un grupo de células que dará origen al embrión denominado masa celular interna (mci) y el primer tejido diferenciado, el trofoblasto que rodea la mci.

Figura: Desarrollo Preimplantacional

# PREPARACION DE UN LABORATORIO PARA REPRODUCCION ASISTIDA

## 1. NORMAS DE TRABAJO PARA EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

### A. Lavado Quirúrgico de Manos e Indumentaria.

El objetivo es limpiar la piel de manos y antebrazos de gérmenes, grasa y otras materias orgánicas, previo a algún procedimiento o manipulación. Este procedimiento permite eliminar la flora microbiana transitoria y disminuir la flora microbiana normal de la piel. El propósito definitivo es prevenir la diseminación de microorganismos por vía mano portadora, evitando la contaminación microbiana durante la manipulación del material biológico. Por otra parte, el uso de los guantes tiene un doble cometido: proteger al operador de la transmisión de patógenos contenidos en líquidos orgánicos o tejidos y reforzar la barrera de control frente a la contaminación por vía manoportadora. Finalmente, el uso de la mascarilla permite evitar la transmisión de microorganismos infecciosos que se propagan a través del aire y aquellos cuyas fuentes de entrada o salida pueden dar al aparato respiratorio.

#### i) Materiales:

- Solución de povidona yodada al 10%, solución de clorhexidina al 4% u otra.
- Cepillo de uñas esterilizado.
- Toalla o compresas estériles.
- Lima para limpiarse las uñas.
- Guantes de látex, estériles y descartables.
- Mascarilla desechable.

#### ii) Procedimiento:

Previo a un procedimiento de reproducción asistida las personas que ingresarán al laboratorio deben vestirse de acuerdo a las normas establecidas para un recinto quirúrgico. Lavar las manos y antebrazos con agua y Povidona, frotándolos por unos minutos hasta obtener bastante espuma, poniendo énfasis en espacios interdigitales y palmas. El lavado debe prolongarse por al menos 3 minutos.

- Enjuagar con agua corriente, desde las manos hacia los codos.
- Cerrar la llave del agua con los codos.
- Secar primero las manos y después antebrazos con toalla individual estéril.

#### iii) Uso de guantes estériles

- Previo lavado quirúrgico de manos, abrir el paquete de guantes (o un ayudante

presentar los guantes). Tomar el primer guante por su cara interna, es decir, por la cara que estará en contacto directo con su piel e introducirlo. Tomar el segundo guante con la mano enguantada, tomándolo por su cara externa e introducirlo.

#### **iv) Uso de la mascarilla**

- Previo lavado de manos, colocar la mascarilla cubriendo nariz y boca, luego amarrarla tomando solamente las tiras.
- Moldear a la altura de la nariz para dejarla cómoda y segura.
- Lavar las manos.

#### **B. Consideraciones Generales:**

- a) Las personas deben usar las uñas cortas, limpias y sin esmalte.
- b) No deben usar joyas.
- c) Las mangas deben estar sobre el codo.
- d) A fin de no contaminar las manos, la mascarilla no debe tocarse, ni colgar al cuello mientras se lleve puesta.
- e) El mal uso de la mascarilla o el uso de mascarillas inadecuadas aumenta la posibilidad de transmisión de microorganismos y da una falsa impresión de seguridad.
- f) El uso de guantes no reemplaza el lavado de manos.
- g) Si los guantes contienen polvos talco, estos deben ser enjuagados con agua estéril y luego se debe proceder a secarlos con un clínico o compresa estéril.

## **2. ACONDICIONAMIENTO FÍSICO DE UN LABORATORIO DE REPRODUCCION HUMANA**

### **A. Aseo del laboratorio**

**Objetivo:** Disminuir al máximo la carga contaminante (virus, bacterias, hongos, partículas en suspensión, fuentes orgánicas, etc) del ambiente del laboratorio, antes, durante y después de cada ciclo de fecundación *in vitro* (FIV).

#### **Materiales:**

- Solución desinfectante de cloro al 0.5 % (5 ml de cloro por cada 995 ml de agua) o una solución comercial como VIREX-Cloro también al 0.5 %.
- Solución para remoción de residuos orgánicos. Se utiliza el detergente DETERGEM.
- Agua y paños limpios.

#### **Procedimiento:**

##### **i) Antes de un procedimiento de IVF**

Como mínimo una semana antes del inicio de un ciclo de fecundación *in vitro* debe efectuarse un aseo terminal del laboratorio de IVF. Este consiste en una limpieza a fondo tanto de pisos, paredes y cielo del laboratorio.

Empapar un paño limpio con solución de DETERGEM y aplicar por todas las superficies (para remover materias orgánicas).

Empapar un paño con solución de cloro al 0.5 % o VIREX-Cloro y aplicar por todas las superficies (para desinfectar), manteniendo ventilado el laboratorio hasta que se sequen las superficies.

## **ii) Durante un procedimiento de FIV**

Se debe realizar una limpieza periódica sólo con agua sobre pisos. Bajo ninguna circunstancia emplear soluciones de detergentes, cloro o desinfectantes durante el procedimiento de fecundación *in vitro* pues son altamente nocivos para los gametos y embriones.

## **iii) Después de un procedimiento de FIV**

Una vez finalizado el ciclo de IVF repetir el aseo terminal del laboratorio de IVF.

### **3 . OTRAS NORMAS DE TRABAJO**

No portar documentos o artículos de uso personal (lápices, relojes, joyas, etc).

Todo traslado de material para los procedimientos de Reproducción Humana debe ser controlado, previamente, por el jefe del laboratorio.

Una vez abierto el laboratorio y antes de realizar cualquier operación proceder al lavado quirúrgico de manos y brazos (según procedimientos), evitando el contacto posterior con materiales o instrumental no esterilizado.

De rutina se recomienda frotar manos con una cantidad discreta de alcohol (70% v/v) toda vez que el operador o auxiliar tomen contacto directo, previo a la manipulación del material biológico, con fluidos orgánicos, elementos, instrumental o equipos no esterilizados.

Activar Cámara de Flujo Laminar y encender platinas termorreguladas (ajustadas en 37 C).

En la limpieza de las superficies de trabajo en la cámara de flujo laminar. Emplear compresas o clínicos estériles y alcohol al 70%.

Aplicar con vaporizador alcohol al 70% sobre las áreas de trabajo e inmediatamente secar con una compresa estéril, deslizándola por arrastre sobre la superficie comprometida.

La termorregulada es el centro de actividad de cada operación que se realiza en la cámara de flujo laminar, por lo que se recomienda guardar los siguientes cuidados:

a) Depositar sólo material estéril en la superficie.

Evitar apoyar manos o brazos sobre el lugar.

La Cámara de Flujo Laminar debe permanecer encendida por lapso de 20 minutos antes de cualquier operación o manipulación en éste ambiente. Durante éste tiempo se recomienda dejar encendida la luz germicida (UV). No efectuar este último paso si hay material biológico expuesto. También, las personas deben hacer abandono del laboratorio de FIV mientras la luz UV este funcionando.

Antes y durante la manipulación de gametos o embriones cuidar de no interrumpir el flujo laminar en la zona de manipulación de éstos. Preocuparse, en todo momento, de no bloquear el flujo laminar por interferencia de objetos dispuestos en el espacio de trabajo. Hacer extensivo estos cuidados durante la manipulación del propio material biológico. Trabajar en todo momento en el centro de la cámara de flujo laminar, pues es la zona en que efectivamente el flujo de aire es horizontal y libre de partículas ambientales.

Durante la manipulación de frascos con medios de cultivo, suero y también de implementos tales como agujas, pinzas, pipetas de vidrio, bulbos, etc., disponer de un mechero encendido para proceder a flamear aquellas partes del material que el operador este manipulando, tales como: tapas y golletes de frascos y botellas de cultivo, puntas de jeringas y pipetas, etc.

En todo momento se debe disponer en el laboratorio de FIV de compresas estériles, agua estéril, peróxido de hidrógeno y alcohol al 70% para limpiar superficies en las que se hayan derramado líquidos orgánicos, tales como: fluido folicular, sangre, suero, medio de cultivo, etc. En estos casos se debe aplicar primero agua para remover componentes orgánicos y luego  $H_2O_2$  en la zona afectada, luego limpiar con compresa estéril y finalmente, con alcohol y nuevamente con compresa estéril. No aplicar soluciones de alcohol sobre componentes orgánicos previa utilización de agua pues el alcohol fija los componentes orgánicos en la superficie.

Se debe tener cuidados en la apertura y manipulación del material estéril. Todo el material de cultivo se encuentra esterilizado por radiación y su duración es indefinida, a menos que el envoltorio plástico que lo contiene sea violado o abierto en un ambiente carente de flujo laminar y/o presión positiva. El instrumental o material que se esteriliza o re-esteriliza, ya sea por gas (Amprolen) o autoclave, tiene duración definida y debe estar convenientemente rotulada su Fecha de Vencimiento. Certificar, antes de su uso, que el material no haya caducado en cuanto a su condición de esterilidad.

## 4. CERTIFICACIÓN DE EQUIPOS

### A. Campana de Flujo Laminar

El programa de mantención de los equipos de flujo laminar incluye:

- a) **Sustitución semestral de Pre-Filtros** . Con esto se evita la saturación de los filtros absolutos y se asegura un correcto y seguro funcionamiento del sistema de flujo laminar.
- b) **Calibración anual del Flujo Laminar**. Se evalúa calidad del flujo laminar y cantidad de partículas en suspensión contenidas.
- c) **Certificación anual tipo D.O.P. a filtros absolutos**. La finalidad de esta prueba es determinar la calidad de aire que esta proporcionando el sistema. Examina las velocidades máximas y mínimas permitidas para asegurar un adecuado Flujo Laminar. Permite detectar fugas y/o deterioros en el filtro absoluto y sus empaquetaduras. La prueba tipo D.O.P. incluye la calibración del equipo mediante la detección de índices de penetración utilizando partículas estándares en tamaño.
- d) **Revisión anual de sellos de cámaras y burletes de goma de filtros absolutos** (con el tiempo pueden ceder y generar escapes en el sistema).
- e) **Controlar la vida útil del tubo UV-Germicida**. Este es operativo hasta las 2.000 horas de uso. Exceder estos tiempos implica no contar con un sistema germicida funcional y da una falsa sensación de seguridad.

#### **Consideraciones Generales:**

- a) No exponer el equipo de Flujo Laminar a corrientes de aire
- b) Limpieza constante del equipo, evitando el uso de soluciones de hipoclorito de sodio, detergentes y/o alcohol concentrado.

### B. Equipos Opticos y Accesorios

Lupas Estereoscópicas, Microscopios Convencionales e Invertidos. Al considerar este tipo de equipos se deben observar tres aspectos:

- a) Elementos Opticos,
- b) Elementos Mecánicos y Pinturas de Revestimiento y,
- c) Accesorios tales como Equipos de Obtención de Imágenes y Microinyección.

#### **i) Elementos Opticos.**

Los componentes ópticos de uso más frecuente y que manipulan

directamente los usuarios, son los objetivos y oculares. Para los primeros la mantención dependerá del grado de uso del equipo, pero si consideramos un Laboratorio de Reproducción Humana cuyas condiciones son las de un pabellón quirúrgico y donde dos o tres usuarios regulares manipulan los equipos con un promedio de 3 o más horas por día. Bajo estas condiciones se debe considerar una rutina de limpieza de los objetivos en forma semanal, empleando una mezcla alcohol-eter al 50%. Para la aplicación de la mezcla sólo se debe usar papel especial para limpieza de cristales, lo importante es no emplear elementos corrosivos que puedan dañar irreversiblemente los objetivos. Otra forma de limpieza es utilizar solución de xilol pero cuidando de no remojar o sumergir los objetivos puesto que el xilol puede corroer o disolver las resinas internas que adhieren los lentes interiores de los objetivos. En general, una frecuencia semanal de mantención proporciona buenas condiciones de operación de los objetivos. Por supuesto, se debe considerar la limpieza toda vez que se produzcan interferencias en los objetivos debido a la presencia de componentes líquidos, físicos o químicos.

En el caso de frecuencias de uso superiores se debe realizar limpieza cada tres días o menos, pero todo dependerá del número de muestras analizadas diariamente y del aseo general del laboratorio, de hecho es posible operar sin problemas los equipos por semanas sin que estos requieran una limpieza profunda.

En cuanto a los oculares sólo se deben limpiar, también con la mezcla alcohol-eter al 50%, la parte del cristal que enfrenta al ojo cada vez que existan manchas o interferencias en esta superficie. Para manchas interiores o partículas de polvo que puedan haberse depositado (generalmente por desarme o conexión de accesorios, cámaras TV, Video, etc) recurrir al representante calificado para realizar aseo en el interior del equipo.

Por último, es conveniente realizar mantención preventiva general de las partes ópticas con el servicio técnico del representante oficial, cada 6 meses por lo menos o a más tardar una vez al año, para asegurar un rendimiento óptimo. En esta mantención se considera desarme parcial del equipo, con aseo interior de oculares, limpieza y aspirado de los tubos binoculares del revolver, adaptadores de video, etc.

## **ii) Elementos Mecánicos y Pinturas de Recubrimiento.**

En general, se considera que para los elementos mecánicos el usuario sólo puede hacer servicio de aseo externo sin interferir en dispositivos mecánicos interiores, ya que esto puede ocasionar alguna falla de operación. Se debe considerar que todos los componentes mecánicos llegan con estrictas calibraciones de fábrica, que por ningún motivo se deben cambiar o alterar. En cuanto al aseo sólo se deben emplear detergentes suaves no corrosivos, aplicándolos con paños suaves y limpios. Por otra parte, las pinturas de recubrimiento tienen por objeto evitar corrosión por acción de agentes químicos, por lo que para una adecuada limpieza se deben utilizar



solamente detergentes suaves no corrosivos. Cuando se presentan manchas adheridas nunca debe rasparse ya que se puede remover parte la pintura y así favorecer el ataque al metal interior del equipo.

### **iii) Accesorios**

#### **a) Equipos de obtención de imágenes.**

Considerando accesorios corrientes como cámaras de video, monitores, etc., para cada marca existirán reglas individuales que deben seguirse en forma precisa, especialmente los tópicos de ajustes de sensibilidad de cámaras y monitores. En estos casos es conveniente revisar en detalle los manuales de funcionamiento y consultar con el representante autorizado, antes de cambiar los parámetros de operación, especialmente los internos. De hecho también en estos casos se considera que los equipos deben operar sin problemas durante largos lapsos de tiempo, salvo que el manual específicamente indique algún tiempo definido para el recambio de algún componente.

#### **b) Equipos de microinyección.**

Los accesorios para micromanipulación generalmente incluyen un conjunto básico de controladores gruesos y finos, que pueden ser manuales o automáticos (la mayoría con sistemas hidráulicos), inyectores de 40 ml y 10 ml y en algunos casos inyectores automáticos. Todos estos componentes están diseñados para operación en forma indefinida y sólo requieren mantención en lo que se refiere a limpieza exterior de las diferentes unidades. Si el usuario detecta problemas de operación, como: fugas o filtraciones del sistema hidráulico, desajustes de operación u otros dirigirse a la fábrica o servicio técnico autorizado para una adecuada calibración de las diferentes unidades, especialmente cuando se trata de micromanipuladores gruesos y finos. En caso de problemas mayores el equipo debe ser retornado a la fábrica para recambio o calibración. Nunca se debe intentar desarmar o modificar la calibración original.

## **C. Incubadoras de CO<sub>2</sub>**

### **i) Control de Temperatura y Nivel de CO<sub>2</sub>**

Se debe realizar un control diario tanto de la temperatura como del nivel de CO<sub>2</sub> de la incubadora. Para un control adecuado de estos parámetros se debe tabular diariamente la información no empleando de guía los parámetros de temperatura y CO<sub>2</sub> proporcionados por el equipo a menos que estos hallan sido previamente calibrados. Para calibrar la temperatura de la incubadora se requiere un termómetro

de precisión ( $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ) certificado que se debe instalar en el interior de la cámara de incubación. La información entregada por este termómetro debe ser empleada para calibrar el sensor de temperatura de la propia incubadora. Por su parte, el nivel de  $\text{CO}_2$  debe ser controlado con un instrumento capaz de medir la tensión del gas dentro de la cámara de incubación de la incubadora. La Fyrita es un aparato ideado con tal propósito. Esta última, contiene en su interior una solución de titulación (KOH) la cual en contacto con  $\text{CO}_2$  reacciona químicamente produciendo un cambio de volumen en la solución proporcional a la cantidad de  $\text{CO}_2$  disuelto. Esto permite cuantificar el porcentaje de  $\text{CO}_2$  contenido en la incubadora y así calibrar lo que registra el equipo. Estos pasos de control y calibración deben ser hechos con el equipo equilibrado y antes de haber realizado cualquier operación o apertura del equipo.

## **ii) Limpieza Interna**

La sanitización de la incubadora se debe realizar mensualmente. Para este procedimiento es preciso desensamblar el interior de la cámara de incubación extrayendo bandejas, paredes y receptáculo de agua. Cada uno de estos componentes debe ser esterilizado por autoclave a  $134^{\circ}\text{C}$  antes de su reposición. Por otra parte, la cámara interna debe ser sanitizada con una solución saturada de bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) durante 20 minutos (esto genera un ambiente alcalino que permite la eliminación selectiva de bacterias y hongos) y luego con alcohol al 70% aplicado con compresas estériles y por arrastre. Finalmente, se procede al ensamble de la cámara de incubación y a la reposición del receptáculo con agua destilada estéril. Todos estos pasos deben realizarse con la incubadora encendida, manteniendo interrumpido el suministro de  $\text{CO}_2$ . Una vez sanitizada la incubadora se recomienda sustituir semanalmente el agua y su receptáculo. También es aconsejable sustituir semanalmente las bandejas por estériles.

## **iii) Calibración y Reemplazo de Componentes de la Incubadora.**

Se debe reemplazar anualmente el kit de descontaminación, empaquetaduras y aspas del ventilador y sensor y filtro bacteriológico de  $\text{CO}_2$ . También, anualmente se debe realizar una limpieza de los circuitos electrónicos y compartimentos acumuladores de polvo y calibración de los circuitos electrónicos (voltajes de la fuente de poder, circuitos de control, etc.). De igual forma, se debe calibrar la temperatura y  $\text{CO}_2$  de la cámara interna de la incubadora, como se detalló en el primer punto de ésta sección. Es importante hacer notar que la calibración y sustitución de componentes debe ser efectuada por personal calificado o por

operadores experimentados.

Por otra parte, el ventilador de homogenización del CO<sub>2</sub> funciona continuamente y por ende está expuesto al desgaste por lo que se recomienda su cambio en forma trienal. Además, si se dispone de 2 o más incubadoras es necesario disponer de un ventilador de repuesto para cada modelo.

## 5. CONTROLES BIOLOGICOS

### A. CULTIVO PARA HONGOS

#### i) **Control del laboratorio y equipos:**

Las incubadoras y el lugar donde se realizan los procedimientos se deben controlar bacteriológicamente para hongos, se realizan en placas de Agar - Saubureaud. Las placas se ponen en forma esteril dentro de las incubadoras. Se recomienda poner las placas 2 días después de realizadas la sanitizacion de éstas. También se ponen placas en la campana de flujo laminar, mesón de trabajo, etc.

#### ii) **Control de los medios de cultivo:**

Este control se realiza con el medio de cultivo donde fueron inseminados los ovocitos y dejados en la incubadora por 5 o 6 días. La frecuencia va a depender de la forma de trabajo, es decir, en serie o en forma continua, de la cantidad de pacientes y de los resultados.

### B. **CULTIVO PARA BACTERIAS**

#### i) **Control laboratorio y equipos:**

Los cultivos para bacterias se realizan en placas de Agar - Sangre (Gram + y -) y Agar - McConkey. Se controlan para bacterias las incubadoras, el agua del receptáculo, con el mismo protocolo descrito en A. para hongos.

#### ii) **Control medios de cultivos**

Si no son comparados en compañías confiables, los medios de cultivo deben ser preparados con agua estéril y excenta de pirógenos, para esto último se recomienda analizar el agua para endotoxinas Test LAL 0.03. Después de preparado, el medio de cultivo debe ser esterilizado por filtración en membrana de poro de 0.22 mm y controlar bacteriológicamente.

## C. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

### i) **Sobrevida Espermática**

Se entiende por sobrevida espermática al % de espermatozoides con motilidad progresiva después de un periodo de incubación largo (18 - 20 hrs). Para realizar esta sobrevida espermática los espermatozoides se separan mediante Percoll o Swim-Up y se incuban en los diferentes medios a probar. Un buen medio de cultivo debe ser capaz de mantener, al menos, el 60% de los espermatozoides con motilidad progresiva al final del tiempo de incubación.

### ii) **Desarrollo de embrión de ratón**

Para este control se utilizan embriones de ratón de 2 células los cuales se ponen en medio de cultivo suplementados con suero y previamente estabilizado en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Se observa diariamente el desarrollo embrionario y a las 72 horas se calcula el porcentaje de blastulación el cual no puede ser menor del 80%.

Este control biológico se debe utilizar cada vez que se prepara un medio de cultivo nuevo y cuando se compran echos; a pesar de que estos vienen con esta prueba realizada pero es necesario asegurarse de que no hubo problemas en su traslado.

# **PROCEDIMIENTOS DE REPRODUCCION ASISTIDA**

## **1. TIPOS DE PROCEDIMIENTO:**

### **A. GIFT : TRANSFERENCIA INTRATUBARIA DE GAMETOS**

El GIFT, es un procedimiento que imita la sucesión de eventos biológicos involucrados en la fertilización natural. En este procedimiento, los ovocitos recuperados por aspiración folicular, junto con los espermatozoides, son colocados en la región ampular del oviducto, ya sea por mini-laparotomía o por laparoscopia. En ambos casos, los espermatozoides y los ovocitos rodeados por sus cubiertas celulares (cumulo y corona), son colocados en un cateter de transferencia, los que pueden estar separados por una burbuja de aire, y luego transferidos a la trompa. De esta manera, el encuentro de los gametos y la fecundación se producen en el oviducto y el desarrollo embrionario ocurre a medida que estos son transportados hacia el útero, produciéndose una perfecta sincronía con los tiempos de transporte y desarrollo embrionario y receptividad uterina.

### **B. FIV-ET : FECUNDACION IN VITRO**

#### **i) FIV CON TRANSFERENCIA EMBRIONARIA AL UTERO (TIU)**

En este procedimiento, los ovocitos recuperados por aspiración folicular son fecundados en una cápsula embriológica con espermatozoides seleccionados por técnicas de separación espermática; de modo que el encuentro de los gametos y la consecuente fecundación ocurren fuera del organismo materno. Los embriones originados son colocados en un cateter de transferencia y depositados en el fondo de la cavidad uterina.

#### **ii) FIV CON TRANSFERENCIA EMBRIONARIA A LAS TROMPAS (TET)**

En este procedimiento, los embriones originados por fecundación in vitro se colocan por vía laparoscópica en la región ampular del oviducto. De modo que el desarrollo embrionario posterior se produce en las trompas y el útero del paciente. De esta manera el embrión se beneficia del microambiente materno, favoreciendo el desarrollo y la calidad embrionaria y asegurando el momento más adecuado para la llegada de los embriones al útero.

### **C. PROST : TRANSFERENCIA DE PRONÚCLEOS A LA TROMPA**

Este procedimiento es similar al TET, la diferencia radica en que en vez de transferirse embriones se transfieren cigotos al estado de pronúcleos.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

### A. FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En la Reproducción Asistida, la calidad del desarrollo embrionario y la consecuente posibilidad de embarazo depende en gran medida de la calidad del medio de cultivo que se utilice.

Los medios de cultivo (MC) más usados se pueden dividir en dos grupos: medios simples y medios compuestos.

#### MEDIOS SIMPLES

Estos son Medios de Cultivo con relativamente pocos constituyentes, siendo la mayoría de ellos sales inorgánicas adicionados con 1 ó 2 compuestos orgánicos como fuentes energéticas, por lo que pueden ser fácilmente preparados en el laboratorio. Estos M.C. también pueden ser obtenidos ya preparados y listos para ser usados.

Corrientemente, los medios de cultivo, tanto simples como compuestos, han sido suplementados con suero humano preovulatorio, obtenido de la paciente el día en que se indica la inyección de hCG ( $\pm$  36 hrs antes de aspiración folicular). El uso de este suero ha dado buenos resultados, sin embargo se corre el riesgo que pueda estar contaminado con virus (HIV, Hepatitis, etc.) y contener anticuerpos que pueden interferir con la fertilización y el desarrollo embrionario. También se puede usar suero de cordón umbilical. Cualquiera sea el suero humano que se use, este debe ser inactivado por 30 minutos a 1 hora a 56°C.

Actualmente se prefiere suplementar los M.C. con albúmina liofilizada, de suero humano (HSA) o con Suero Sintético Substituto (SSS).

Los Medios Simples más usados son: 1) Human Tubal Fluid (HTF), 2) Earle´s Balanced Salt Solution (EBSS).

i) **HUMAN TUBAL FLUID (HTF)**, su formulación es la siguiente:

COMPONENTES	mM	g/Lt
1. NaCl	101.60	5.900
2. KCl	4.70	0.360
3. MgSO <sub>4</sub>	0.20	0.024
4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.37	0.050
5. CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.04	0.300
6. NaHCO <sub>3</sub>	25.00	2.100

7. GLUCOSA	2.78	0.500
8. PIRUVATO de Na	0.33	0.036
9. LACTATO de Na	21.40	2.400
10. PENICILINA-G	100 UI/ml	0.060
11. ESTREPTOMICINA-SO <sub>4</sub>	50 mg/ml	0.050
12. ROJO FENOL		0.005

Osmolaridad:  $280 \pm 5$  mOsmol, pH 7.3 - 7.4 (bajo tensión de CO<sub>2</sub> al 5%)

Este medio debe ser suplementado con suero al 10 ó 15%.

### ii) HTF MODIFICADO

El HTF puede ser modificado para ser usado sin tensión de CO<sub>2</sub>. Para esto, el NaHCO<sub>3</sub> debe ser rebajado a 4.0 mM y ser adicionado con Hepes a una concentración de 21 mM. Llevar a pH 7.3 - 7.4 con NaOH 1 N. El HTF ya preparado puede ser adquirido en IRVINE SCIENTIFIC y en GIBCO.

### iii) EARLE'S BALANCED SALT SOLUTION (EBSS), su fórmula es la siguiente :

COMPONENTES	mM	g/Lt
1. CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.80	0.265
2. MgSO <sub>4</sub> (Anhidro)	0.80	0.097
3. KCL	5.30	0.400
4. NaCl	116.0	6.800
5. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Anhidro)	0.90	0.122
6. GLUCOSA	5.5	1.000

Este medio listo para ser usado, es comercializado por MEDI CULT, bajo el nombre de "*Flushing Medium*" e "*IVF Medium*". En estos medios el EBSS está suplementado con Piruvato de Na, Suero Sintético, Albúmina de suero humano (HSA) y antibióticos.

### iv) MEDIO DE CULTIVO P-1

Este medio de cultivo fue desarrollado por el Dr. Thomas B. Pool, y se caracteriza por ser un medio exento de glucosa y fosfato inorgánico. Al presente aún se encuentra en una etapa experimental, pero por los resultados logrados, en relación a las tasas de fecundación, desarrollo e implantación, creemos de interés incluirlo en este manual. Su

fórmula es:

COMPONENTES	mM	g/Lt
1. NaCl	101.60	5.933
2. KCl	4.69	0.349
3. MgSO <sub>4</sub>	0.20	0.024
4. CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.04	0.300
5. NaHCO <sub>3</sub>	25.00	2.100
6. PIRUVATO de Na	0.33	0.036
7. LACTATO de Na	21.40	2.398
8. TAURINA	0.05	0.006
9. CITRATO de Na.2H <sub>2</sub> O	0.51	0.150
10. GLUTAMINA	1.00	10 mg/ml
11. ROJO FENOL	0.005 gr/Lt	0.005

Este medio, listo para ser usado, es vendido por IRVINE SCIENTIFIC. Otro medio de cultivo similar al P-1, sin glucosa y sin fosfato inorgánico, es el “QB XI-HTF” desarrollado por P. Quinn. Este medio lo comercializa GIBCO.

## MEDIOS COMPUESTOS

Estos medios contienen sales inorgánicas y compuestos orgánicos como amino ácidos, vitaminas, nucleósidos, etc. Los más usados son:

- i) Medio HAM F-10
- ii) MINIMAL ESSENTIAL MEDIUM (MEM)
- iii) MENEZO B-2

Los medios Ham F-10 y MEM se pueden adquirir en compañías comerciales como SIGMA y GIBCO, en envase para preparar 1 Lt de medio. Es recomendable comprar estos medios sin NaHCO<sub>3</sub>, ya que la concentración de esta sal dependerá del uso que se le desee dar. Si se van a usar bajo tensión de CO<sub>2</sub> al 5%, el NaHCO<sub>3</sub> se debe agregar a una concentración de 25 mM. Si se van a usar sin tensión de CO<sub>2</sub> se debe agregar NaHCO<sub>3</sub> a una concentración de 4 mM, y además, adicionarlo con HEPES 21 ó 25 mM.

Además de NaHCO<sub>3</sub> se debe agregar, Lactato de Ca, antibióticos (que pueden ser



Penicilina, G-Estreptomicina-SO<sub>4</sub> o Gentamicina) y suero al 10 ó 15%.

## **B. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

### **MATERIALES**

- Agua ultra-pura con una resistencia de 15 a 18 W Ohms, esterilizada en membrana de poro de 0.22 mm y despirogenada. Agua con estas características se puede obtener con los sistemas de purificación de agua Milli Pore.
- Matraz de volúmen aforado.
- Osmómetro
- Balanza Analítica.
- Agitador magnético.
- Cámara de Flujo Laminar.
- Sistema de esterilización por filtración con membrana de poro de 0.22 mm.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml.
- pHmetro

#### **i) Ham's F-10 o MEM**

- 1) Diluir en un matraz aforado de 1 litro, conteniendo 500 a 600 ml de agua ultra pura, un envase para 1 litro del medio en polvo. Agitar hasta disolver completamente.
- 2) Agregar 2.1 gr de NaHCO<sub>3</sub> y disolver.
- 3) Agregar 0.246 gr de Lactato de Ca.
- 4) Agregar 0.060 gr de Penicilina-G y 0.050 gr de Estreptomicina-Sulfato.
- 5) Aforar hasta 1 litro con agua ultra pura.
- 6) Medir la Osmolaridad del medio y ajustarlo a  $280 \pm 5$  mOsm.

### **FORMULA PARA AJUSTAR LA OSMOLARIDAD**

$$\frac{\text{Osmolaridad Observada} - \text{Osmolaridad Deseada}}{\text{Osmolaridad Observada}} \times \text{Volúmen de medio preparado}$$

### **PROCEDIMIENTO :**

Medir la osmolaridad del medio recién preparado (Osmolaridad Observada), restar la Osmolaridad deseada (p. ej. 280), el resultado dividirlo por la osmolaridad observada y multiplicar por el volumen, en ml, del medio preparado (por ejemplo: 1000 ml). El resultado obtenido es la cantidad de medio que se debe retirar del medio preparado y reemplazarlo por igual cantidad de agua ultra pura. Volver a medir la osmolaridad para

comprobar la osmolaridad alcanzada.

Finalmente, el medio se debe suplementar con suero a una concentración de acuerdo al procedimiento en el cual será usado y luego esterilizar por filtración en membrana de 0.22 mm.

Los medios compuestos también se pueden usar sin tensión de CO<sub>2</sub> al 5%. Para esto se debe usar Hepes y NaHCO<sub>3</sub> en las mismas concentraciones indicadas en la preparación de los Medios Simples.

En la actualidad, en el mercado Norteamericano y Europeo, existen diferentes Medios de Cultivo listos para ser usados. Ofrecen medios para todos los procedimientos de Reproducción Asistida, como aspiración folicular, cultivo de ovocitos y embriones, preparación de espermatozoides, ICSI y criopreservación de embriones y espermatozoides. Estos medios no necesitan ser suplementados, ya que vienen adicionados con suero sintético (SSS) el cual es químicamente definido y por lo tanto, exento de los riesgos del suero humano antes mencionado.

### **C. MEDIOS PREPARADOS DE FABRICA**

Estos medios son los ofrecidos por:

#### **MEDI CULT**

**Flushing Medium**, para la aspiración folicular y para la selección de espermatozoides (Contiene EBSS más piruvato, SSS, Hepes, HSA y antibióticos).

**IVF Medium**, para el cultivo de ovocitos y embriones (Contiene EBSS, piruvato, SSS, NaHCO<sub>3</sub>, HSA, Insulina y antibióticos).

**M3-Medium**, para el cultivo prolongado de embriones 3 a 5 días (Contiene MCDB, que es una modificación de Ham F-10 y F-12, SSS, HSA y antibióticos).

#### **SCANDINAVIAN IVF SCIENCE**

**ASP-100**, para la aspiración folicular (Contiene como aditivos Heparina y Hepes).

**IVF-50**, para el cultivo de ovocitos y embriones (Contiene como aditivos HSA, NaHCO<sub>3</sub> y antibióticos).

#### **CCD**

**INRA MENEZO B2 MEDIUM**, este medio de cultivo se puede utilizar para espermatozoides, cultivo de ovocitos y embriones, ICSI y sistemas de desarrollo embrionario en co-cultivos. Como aditivos contiene Albúmina de Suero Bovino (BSA), NaHCO<sub>3</sub> y antibióticos.

## **D] NUEVOS MEDIOS DE CULTIVO PARA SUSTENTAR EL DESARROLLO IN VITRO DE CONCEPTI.**

□ El crecimiento de *concepti* preimplantacionales ha sido estudiado en una variedad de modelos animales. Los embriones preimplantacionales de mamíferos parecen requerir ciertos sustratos energéticos y otros metabolitos (tales como amino ácidos) para su desarrollo *in vitro*. En el hamster, por ejemplo, la remoción de glucosa y fosfato y la inclusión de glutamina e hipotaurina en el medio de cultivo optimizan la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones. De igual manera los embriones humanos resultan beneficiados al ser cultivados en medios libres de glucosa. Esta modificación del medio de cultivo favorece el metabolismo oxidativo de *conceptus* humanos preimplantacional. Los medios convencionales utilizados actualmente para el cultivo *in vitro* de *concepti* humanos (tales como Ham F-10, HTF, etc.) contienen glucosa. Actualmente, se encuentra disponible comercialmente un medio libre de glucosa (P1), que ha demostrado favorecer el metabolismo de *concepti* humanos preimplantacionales cultivados *in vitro* (Johnson y col., 1997).

□ Recientemente, se ha demostrado que los requerimientos del cultivo cambian dependiendo del estado del desarrollo embrionario. Por tanto, las necesidades metabólicas del *conceptus* humano cambian desde el estado de 8 células en adelante. Además, ésta transición se caracteriza por un cambio en el control de la expresión génica del *conceptus*, en donde el control genético materno es sustituido por el control genético embrionario.

Los intentos por optimizar las condiciones de cultivo se han centrado en el desarrollo de un único medio de cultivo capaz de sustentar todos los estados previos a la implantación. En general, los medios actualmente empleados en el cultivo de *concepti* humanos son de dos categorías: simples o complejos. Los primeros son soluciones salinas balanceadas que contienen carbohidratos como fuentes energéticas, del tipo piruvato, lactato y glucosa, en tanto, los segundos son una mezcla compleja de sales, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, etc., que han sido desarrollados para el cultivo de células somáticas.

Los *concepti* humanos son rutinariamente transferidos al útero en los días 2 a 3 de desarrollo, sin embargo, las tasas de implantación y embarazo resultantes son considerablemente bajas, con sólo 10 % de *cocepti* transferidos que culminan en un nacido vivo. La posibilidad de cultivar los *concepti* humanos hasta el estado de blastocisto ayuda a resolver este problema, pues permite sincronizar el *conceptus* con el tracto reproductivo femenino y también identificar aquellos *concepti* con un pobre potencial de desarrollo. El cultivo y transferencia de blastocistos humanos incrementa las tasas de implantación (Gardner y col., 1998) en comparación a transferencia de *concepti* de menor desarrollo y reduce la necesidad de transferir múltiples embriones.

Las estrategias actuales para el cultivo *in vitro* de embriones humanos consideran

la formulación de medios de cultivo complejos que cubran las reales necesidades metabólicas del *conceptus* humano, lo que permite llevar con éxito el desarrollo hasta el estado de blastocisto. El grupo de Gardner (1998) ha desarrollado los medios S1 y S2, disponibles comercialmente, para cultivo hasta blastocisto (5-6 días). Los *concepti* humanos se cultivan en S1 hasta alcanzar 8 células y luego son transferidos a S2. El uso secuencial de estos medios es capaz de sustentar el desarrollo hasta blastocisto con una viabilidad y número de células significativamente mayor al obtenido a través del uso de medios de cultivo convencionales. S1 y S2 se diferencian en cuanto al contenido de glucosa y presencia de amino ácidos esenciales (Gardner y col., 1998).

## El Co-Cultivo de *Concepti* con Células Somáticas

Los beneficios del co-cultivo con células somáticas de variado origen, tales como: epitelios del tracto reproductor femenino, líneas celulares establecidas (ejemplo, células Vero), células de granulosa, etc. (Walker y col., 1997; Dirnfeld y col., 1997; Ventrubá y col., 1996; Ben-Chetrit y col. 1996; Nieto y col., 1996; Lai y col., 1996), ha mostrado ser efectivo en superar el bloqueo que experimentan los *concepti* humanos cultivados *in vitro*, aumentando el número de *concepti* capaces de alcanzar el estado de blastocisto. El co-cultivo tiene otros efectos beneficiosos sobre el desarrollo embrionario, como son: aumenta el número de células con que los *concepti* alcanzan la blastulación, disminuye la fragmentación de los blastómeros y mejora sustancialmente la viabilidad de los *concepti* destinados a la transferencia. Los estudios sugieren que el co-cultivo aporta factores embriotróficos y tiene un efecto protector del cultivo a través de la remoción de factores nocivos (radicales libres) para el desarrollo embrionario.

Para implementar el co-cultivo en los programas de reproducción humana se requiere disponer de alguna línea celular o biopsias de tejido del tracto reproductor femenino (fimbria, trompa o endometrio). Siguiendo protocolos establecidos se pueden obtener fácilmente cultivos primarios, sobre los cuales es posible cultivar los *concepti* humanos.

## **E. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LAS DIFERENTES ETAPAS DE UN PROCEDIMIENTO DE FECUNDACION ASISTIDA**

### **1) MEDIO DE ASPIRACION FOLICULAR**

Buffer Dulbecco adicionado con antibióticos (Penicilina-G: 100 U/ml, Estreptomicina-sulfato: 50 mg/ml) y Heparina (30 UI/ml). pH 7.4 y  $280 \pm 5$  mOsmol.

### **2) MEDIO DE INSEMINACION**

Medio de Cultivo suplementado con suero al 7 ó 10 %.

### **3) MEDIO DE CRECIMIENTO**

Medio de Cultivo suplementado con suero al 10 ó 15 %.

#### **4) MEDIO DE TRANSFERENCIA**

Medio de Cultivo suplementado con suero al 30 ó 50 %.

### **3. METODOS DE PREPARACION Y SELECCION DE ESPERMATOZOIDES**

En la preparación de las muestras de espermatozoides para la reproducción asistida se puede usar cualquiera de los medios ya mencionados, suplementados con suero natural o sintético al 7 ó 10%.

Una vez obtenida la muestra de semen, ya sea por masturbación o con condón no tóxico, se debe permitir la licuefacción por 30 minutos a 37 °C. Si al cabo de este tiempo el semen permanece no licuado, se puede inducir su licuefacción haciéndolo pasar por una jeringa provista de una aguja del N°21, por una o más veces. Una vez obtenida la licuefacción, se deben valorar los diferentes parámetros espermáticos según los criterios OMS (1992). Luego, se procede a la separación espermática. Para esta finalidad se usan diferentes técnicas, siendo las más usadas la de Swim-up y la separación en gradientes de Percoll.

#### **A) SEPARACION POR SWIM-UP**

Esta técnica debe ser usada cuando la muestra de semen tiene una valoración normal en sus parámetros espermáticos de acuerdo al criterio de normalidad OMS:

- Concentración : 20 o más millones por ml.
- Motilidad: 50% o más con motilidad A+B, o 25% o más con motilidad A.
- Morfología: 30% o más con morfología normal.

Esta técnica aprovecha la propiedad de motilidad progresiva rápida de espermatozoides presentes en la muestra de semen, los cuales son capaces de “nadar” hacia el medio de cultivo.

##### **i) Materiales**

1. Medio de Cultivo. Se recomienda usar medios simples como HTF, suplementado con suero al 7 % o con HSA al 0.4 %. Estos MC pueden o no ser modificados con buffer Hepes 21 ó 25 mM, a pH 7.4.
2. Tubos de cultivo de 17 x 100 mm.
3. Pipetas Pasteur estériles o pipetas volumétricas de 1 ml.. Tubos de centrifuga de 17 x 120 mm.

## ii) Procedimiento

1. En un tubo de centrifuga, centrifugar la muestra de semen a 800 x g por 10 minutos.
2. Desechar el sobrenadante.
3. Cuidando de no alterar el pellet formado, depositar sobre éste 2 ml de MC.
4. Colocar el tubo en incubadora a 37°C por 30 minutos a 1 hora.
5. Aspirar el sobrenadante y colocarlo en un tubo conteniendo 5 ml de MC.
6. Centrifugar a 300 g por 5 min.
7. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con MC hasta la concentración deseada.
8. Evaluar los parámetros espermáticos según el criterio de normalidad OMS.

## iii) Procedimiento SWIM-UP MODIFICADO

1. Poner 2 ml de MC en un tubo de cultivo.
2. Depositar en el fondo del tubo, bajo el MC, 1 ml de semen.
3. Colocar el tubo en una gradilla, con inclinación de 45°, y dejar por 30 ó 60 minutos en incubadora a 37°C.
4. Recoger el sobrenadante y transferirlo a un tubo de centrifuga con 5 ml de MC.
5. Centrifugar a 300 x g por 5 a 7 minutos.
6. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con una cantidad de MC adecuada a la concentración deseada.
7. Evaluar la concentración, motilidad y morfología según el criterio de normalidad OMS.

## **B. SEPARACION POR GRADIENTES DE DENSIDAD**

Esta técnica de separación espermática se puede usar al margen de la calidad del semen.

### i) Materiales

1. Percoll
2. Medio de Cultivo 10 veces concentrado (MC 10X)
3. Medio de Cultivo 1X, suplementado con suero al 7% ó 10%.
4. Tubos de centrifuga estériles de 17 x 120 mm.
5. Pipetas volumétricas estériles de 1 y 5 ml.
6. Percoll Isotónico.
7. Percoll al 95%, 70% y 50% (para tres gradientes), o bien 40% y 80% (para dos gradientes).

El MC modificado con Hepes y el Percoll Isotónico, así como las diferentes

concentraciones de Percoll, se pueden obtener ya preparadas y listas para usar (Irvine Sc, MediCult, etc.).

ii) Procedimiento

1. Depositar en un tubo de centrífuga 1 ml de la solución de Percoll de mayor concentración, y sobre esta, colocar cuidadosamente 1 ml de la(s) de menor concentración, de modo que las diferentes gradientes se vean separadas por un menisco de interfase.
2. Depositar suavemente sobre la gradiente de menor concentración 1 ml (hasta 1.5 ml) de la muestra de semen.
3. Centrifugar a 300 - 500g por 15 a 20 minutos
4. Aspirar el pellet y parte de la gradiente de mayor concentración y resuspenderlo en 5 ml de MC.
5. Centrifugar a 300g por 7 minutos.
6. El pellet obtenido se vuelve a lavar en 5 ml de MC por centrifugación a 300g por 7 minutos.
7. Resuspender el pellet con una cantidad de medio adecuada a la concentración deseada.
8. Evaluar la concentración, motilidad y morfología.
9. Los espermatozoides separados se pueden guardar a temperatura ambiente o en incubadora a 37°C.

iii) Procedimiento minigradientes de Percoll

Esta técnica de Percoll se utiliza cuando la muestra de semen pertenece a pacientes oligospermicos (recuento espermático <20 Millones/ml).

1. Diluir la muestra de semen 1:1 con MC de inseminación.
2. Centrifugar a 800g por 10 minutos.
3. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de MC.
4. Centrifugar a 300g por 5 minutos y resuspender el pellet en 1 ml.
5. Cargar un tubo de centrífuga con 0.3 ml de Percoll 80% y sobre esta 0.3 ml de Percoll 40%.
6. Centrifugar a 300-500 g por 20 a 40 minutos.
7. Aspirar el pellet, resuspenderlo en 5 ml y centrifugar a 300g por 5 minutos.
8. Resuspender el pellet con MC a la concentración deseada.

#### **4. RECEPCION DE OVOCITOS DURANTE LA ASPIRACION FOLICULAR**

#### A. MATERIALES:

- Tubos estériles de 17 x 100 mm.
- Cápsulas de 60 x 15 mm (Falcon 3037, para cultivo de órganos)
- Cápsulas de 60 x 15 mm (Falcon 3002, para cultivo de tejido)
- Pipetas volumétricas estériles de 5 ó 10 ml.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Platina termoregulada a 37 °C.
- Calentador de tubos termoregulado a 37 °C.
- Medio de cultivo suplementado con suero al 7 ó 10%.
- Buffer Dulbecco suplementado con antibióticos, para lavado y aspiración folicular.

Formulación del Buffer Dulbecco:

COMPONENTES	gr/Lt	mM
1. MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.100	0.490
2. KCl	0.200	0.373
3. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.200	1.460
4. NaCl	8.000	137.000
5. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.150	8.099
6. Penicilina-G	60 mg/Lt	
7. Estreptomicina-SO <sub>4</sub>	50 mg/Lt	

Llevar a pH 7.4 (con NaOH 1 N, ó HCl 1 N) y ajustar osmolaridad a 280 ± 5 mOsm.

#### **B. PROCEDIMIENTO DE RECEPCION DE OVOCITOS ASPIRADOS**

El día anterior a la aspiración folicular se recomienda dejar preparadas las cápsulas de doble compartimento y guardadas hasta el día siguiente en incubadora a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Estas cápsulas se preparan con 2 ml de MC en el compartimento marginal y 1 ml en el depósito central. El número de cápsulas a preparar debe estar de acuerdo al número de folículos que se espera aspirar en cada paciente. También se debe dejar a 37°C el buffer Dulbecco.

#### **El día de la aspiración folicular:**

1. Después de recibir el tubo con la aspiración del líquido folicular, depositar el contenido del tubo en una o dos cápsulas de 60 x 15 mm.
2. Revisar bajo la lupa la presencia de 1 ó más complejos cúmulo-corona-ovocitos (CCO).
3. Ubicado un CCO, transferirlo con ayuda de una pipeta Pasteur a una cápsula de doble



- pocillo, lavarlo 2 ó 3 veces en el compartimento marginal.
- Transferir el CCO lavado al compartimento central de la cápsula y luego devolverla a la incubadora y dejar estabilizando al menos por 1 hora.
  - Evaluar la madurez de los CCO con aumento mayor de la lupa o con aumento 20X del microscopio invertido, y clasificarlos de acuerdo a la morfología del cúmulo y corona.

### **C. CLASIFICACION DEL COMPLEJO CUMULO-CORONA-OVOCITO**

La clasificación del CCO se realiza atendiendo al:

- Tamaño y filancia del cúmulo.
- Grado de dispersión de las células del cúmulo y de la corona.

Sobre la base de estos criterios se puede realizar la siguiente clasificación (figura 3 y 4):

**Madurez 1, o Inmaduro (M-1):** Cúmulo pequeño o grande, con poca filancia. Corona compacta formando una capa densa alrededor del ovocito (figuras 3a y 4a).

**Madurez 2, o Intemedio (M-2):** Cúmulo grande, disperso y filante. Corona con inicio de dispersión (con pequeños espacios entre sus células), pero aún formando una capa densa alrededor del ovocito (figuras 3b y 4b).

**Madurez 3, o Maduro (M-3):** Cúmulo grande, disperso y filante. Corona radiada característica, con espacios entre las células en forma de rayos, pudiendo observarse los límites del ovocito (figuras 3c y 4c).

**Madurez 4, o Post-maduro (M-4):** Cúmulo muy disperso, grande o pequeño por fragmentación del mismo. Muy filante, Corona inexistente. El ovocito se puede observar con nitidez e identificar el primer corpúsculo polar.

### **Figuras 3 & 4**

## **5. INSEMINACION**

El número de espermatozoides que generalmente se usan para la fecundación in vitro varía entre 50,000 y 100,00/ml. Sin embargo, concentraciones de 25,000 a 1'000,000/ml también son usadas sin grandes diferencias en las tasas de fecundación.

### **A. EN CAPSULA ABIERTA**

- Materiales:

- MC de Inseminación (suplementado con suero al 7 ó 10 %), mantenido desde

el día anterior a 37°C y bajo tensión de CO<sub>2</sub> al 5 %.

2. Cápsulas 60 x 15 mm, con doble pocillo.
3. Pipeta automática de 5-40 mL
4. Puntas de pipeta estériles.
5. Pipetas volumétricas de 1 y 5 ml.
6. Pipetas Pasteur estériles.

iii) Procedimiento:

1. Preparar cápsulas de doble pocillo, colocando 2 ml de MC en el compartimento marginal y 1 ml en el compartimento central. Preparar estas cápsulas al menos 1 hr antes de la inseminación, con la finalidad de permitir que el MC se equilibre a la temperatura y tensión de CO<sub>2</sub> de la incubadora.
2. Colocar 1 ó 2 ovocitos por cápsula para ser inseminados.
3. Con ayuda de una pipeta automática, inseminar con 50.000 ó 100.000 espermatozoides por ml de MC. Es conveniente que el volumen que contenga los espermatozoides no sea mayor de 20 mL.
4. Dejar la cápsula de inseminación por 15 a 18 hrs. en la incubadora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Este es el tiempo adecuado para observar los pronúcleos (PN) y comprobar la fecundación.

## **1) INSEMINACION BAJO ACEITE MINERAL**

i) Materiales

1. Cápsulas estériles de 35 x 10 mm ó de 60 x 15 mm.
2. Medio de Cultivo de Inseminación suplementado con suero al 7 ó 10 %
3. Aceite Mineral de baja densidad (0.8 g/ml) y calidad embryo tested.
4. Pipeta automática de 10-40 mL.
5. Pipeta automática de 1-10 mL.
6. Puntas de pipeta estériles.
7. Pipetas Pasteur estériles.
8. Pipetas volumétricas de 5 ml estériles.

ii) Procedimiento:

1. Bajo cámara de Flujo Laminar, preparar las cápsulas de inseminación con 4 gotas de lavado de 30 ml de MC y 4 a 6 gotas de inseminación de 20 a 30 mL de MC para la inseminación.
2. Cubrir las gotas con aceite mineral.

3. Dejar la cápsula de inseminación estabilizando en incubadora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5 %, por al menos 1 hr.
4. Con ayuda de una pipeta Pasteur lavar los CCO en las gotas de MC de lavado y colocar 1 CCO por gota de inseminación.
5. Estabilizar en incubadora por 15 minutos.
6. Inseminar con 20.000 espermatozoides (en gota de 20 mL) o con 30.000 espermatozoides (en gota de 30 mL) en un volumen de no más de 5 mL.
7. Dejar la cápsula de inseminación por 15 a 18 horas en incubadora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

## **6. EVALUACION DE LA FECUNDACION**

### **A. MATERIALES**

Mechero  
Pipetas Pasteur estériles  
Cápsulas de 60 x 15 mm o de 35 x 10 mm.

### **B. PROCEDIMIENTO**

1. Observar los ovocitos inseminados a las 15 ó 18 horas post-inseminación.
2. Comprobar la total disociación de las células del cúmulo ooforo.
3. Disociar, bajo lupa, las células de la corona radiata con ayuda de una pipeta Pasteur estirada en la llama del mechero. La punta de la pipeta debe quedar con un diámetro de  $\pm 150$   $\mu$ m.
4. Con la pipeta Pasteur estirada succionar y botar repetidamente el ovocito hasta que la corona se desprenda.
5. Evaluar la fecundación identificando la presencia de 2 pronúcleos (PN) en el citoplasma del ovocito y de 2 corpúsculo polares en el espacio perivitelino.
6. Observar los PN con aumento mayor de la lupa. Para una mejor definición de los PN y de los corpúsculo polars, observar con aumento 20x del microscopio invertido.
7. Lavar por 3 veces los ovocitos fecundados y transferirlos a una cápsula con MC nuevo y guardar en incubadora.

### **C. ANORMALIDADES DE LA FECUNDACIÓN**

Como resultado de la fecundación in vitro, es posible encontrar cigotos con un número anormal de PN:

- i) **PRONÚCLEO ÚNICO.** Este fenómeno se puede deber a:

- a) Asincronía en la aparición de los pronúcleos
- b) No desarrollo del PN materno o paterno.
- c) Activación del ovocito debido a una breve exposición a temperaturas por sobre los 37°C, o a un repentino cambio osmótico.

Ambos problemas pueden inducir a una ruptura precoz de los gránulos corticales con la consiguiente reacción de zona y la imposibilidad de penetración espermática.

Estos cigotos pueden clivar y dar origen a embriones anormales, la mayoría de ellos inviábiles pero con riesgo potencial de dar lugar a un embarazo molar, corioncarcionoma, aborto espontáneo o mortinato.

ii) **POLIPLOIDÍA**: Formación de 3 ó más PN, lo cual se debe a:

- a) Falla en el bloqueo de la polispermia (generalmente sucede en ovocitos post-maduros).
- b) Retención del 2° corpúsculo polar.
- c) Fecundación del ovocito por un espermatozoide binucleado o a la fecundación de un ovocito binucleado.

Estos cigotos pueden dar origen a embriones morfológicamente normales, pero no viables.

## **7. DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL IN VITRO**

El desarrollo embrionario se puede realizar en cápsula abierta o bajo aceite mineral.

### **A. DESARROLLO EN CAPSULA ABIERTA**

i) Materiales:

1. Cápsulas de 35 x 10 mm ó de 60 x 15 mm.
2. Medio de Cultivo de Crecimiento (suplementado con suero al 10 ó 15%).
3. Pipetas Pasteur estériles, estiradas bajo llama, con un diámetro de  $\pm$  200 mm.
4. Mechero.

ii) Procedimiento:

1. Colocar uno o más cigotos en una cápsula de doble pocillo, preparada con MC

de Crecimiento y estabilizada desde el día anterior, o al menos con 1 h de anticipación.

2. Dejar los cigotos en incubadora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5 % hasta el día siguiente.

## **B. DESARROLLO BAJO ACEITE MINERAL**

### **i) Materiales:**

1. Cápsulas de 35 x 10 mm ó de 60 x 15 mm.
2. Aceite Mineral de baja densidad, embryo tested.
3. Pipetas Pasteur estériles, estiradas a un diámetro de  $\pm 200$   $\mu$ m.
4. Medio de cultivo de crecimiento.
5. Pipetas volumétricas estériles de 5 ml.
6. Pipetas automáticas de 1-10 ml y 10-40 ml.
7. Puntas de pipeta estériles.

### **ii) Procedimiento**

1. Preparar con al menos 1 hora de anticipación una cápsula, de 35 x 10 mm ó 60 x 15 mm, con 4 a 8 gotas de MC de Crecimiento y cubrir con aceite mineral.
2. Transferir 1 cigoto a cada una de las gotas de MC.
3. Dejar en incubadora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% hasta el día siguiente (2º día de desarrollo) o subsiguiente (3er día de desarrollo).

## **C. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO**

El criterio para evaluar la calidad embrionaria se realiza atendiendo al número y morfología de los blastómeros y a la presencia de fragmentación celular. Con este criterio se puede realizar la siguiente clasificación de los embriones:

**GRADO 1:** Embrión con blastómeros de igual tamaño (simétricos), sin presencia de fragmentación y con citoplasma claro y homogéneo (figuras 5a y 6a).

**GRADO 2:** Embrión con blastómeros simétricos y con fragmentación del 10 al 20% (figuras 5b y 6b).

**GRADO 3:** Embrión con blastómeros asimétricos o con un 20 a 50% de fragmentación (figuras 5c y 6c).

**GRADO 4:** Embrión con clivaje asimétrico y fragmentación blastomérica mayor al 50% (figuras 5d y 6d).

**Figure Clasificación de Embriones (Grado y Fig. 6)**

## **7. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

La transferencia de los embriones se puede realizar al útero o a las trompas.

### **A. MATERIALES**

Cápsulas con doble pocillo.

Medio de cultivo de transferencia.

Pipetas volumétricas estériles de 5 ml.

Mechero.

Pipetas Pasteur estériles, estiradas en la llama de un mechero y con un diámetro punta de  $\pm 200$  mm.

Jeringas de 1 ml.

Cateter de transferencia.

Para transferencia a las trompas (TET): cateter de transferencia laparoscópica.

### **B. PROCEDIMIENTO**

1. Preparar con al menos 1 hr de anticipación una cápsula con doble pocillo con medio de cultivo de transferencia
2. Cambiar los embriones desde la cápsula de crecimiento a la cápsula de transferencia, lavando los embriones en el compartimento marginal y luego transferirlos al compartimento central.
3. Guardar la cápsula de transferencia en la incubadora hasta el momento de la transferencia al útero o a las trompas.
4. Para la transferencia:
  - a) Colocar la jeringa de 1 ml al cateter de transferencia.
  - b) Ubicar la punta del cateter en el compartimento central de la cápsula de transferencia y aspirar  $\pm 10$  mL de medio.
  - c) Levantar la punta del cateter y aspirar débilmente algo de aire.
  - d) Volver a hundir la punta del cateter en el medio y aspirar un poco de medio, de modo que se forme una pequeña burbuja, e inmediatamente aspirar los embriones en no más de 5 ml de MC.
  - e) Levantar la punta del cateter y aspirar  $\pm 10$  ml de MC. De esta manera los embriones quedarán en un "sandwich" de medios de cultivo, que los

protegerá y asegurará su transferencia al útero o a las trompas.

### **C. CLASIFICACION DE LA TRANSFERENCIA**

Debe quedar registrado si la transferencia de embriones fue:

**1) FACIL:** Sin dificultad en la introducción del cateter de transferencia por el cuello uterino, cualquiera sea el tipo de cateter que se use. Al extraer el cateter desde el cuello, no debe ser contaminado con sangre.

**2) DIFÍCIL:** Dificultad en la introducción del cateter, si hubo necesidad de cambiar cateter o contenido de sangre en la punta del cateter al ser extraído del cuello uterino. Si todos o algún embrión queda retenido en el cateter y que requiera de una segunda transferencia.

# FECUNDACION ASISTIDA: INYECCION INTRACITOPLASMATICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

La Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), es una técnica de fertilización in vitro, introducida por G. Palermo y col. en 1992. El ICSI está indicado para parejas infértiles por factor masculino severo, azoospermias obstructivas y aplicable también a parejas infértiles con sucesivas fallas de fertilización in vitro. Como su nombre lo indica, el ICSI consiste en la introducción mecánica, con ayuda de un sistema de micromanipulación, de un solo espermatozoide en el citoplasma de un ovocito.

## 1. PREPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PARA ICSI

### A. MATERIALES

1. Medio de cultivo tamponado con Hepes 21 ó 25 mM, suplementado con suero al 10%.
2. Percoll isotónico.
3. Tubos de centrifuga estériles.
4. Pipetas volumétricas estériles de 1 y 5 ml.
5. Centrifuga.
6. Cámara de recuento celular Neubauer.

### B. PROCEDIMIENTO

1. Diluir la muestra de semen 1:1 con medio de cultivo y centrifugar por 7 minutos a 800g.
2. Aspirar el sobrenadante hasta dejar 2 ml de semen concentrado. Botar el resto de sobrenadante.
3. Evaluar motilidad y concentración espermática.
4. Preparar en un tubo de centrifuga 3 gradientes de Percoll (90, 70 y 50 %) si la muestra contiene al menos 5 Mill/ml y motilidad A+B del 40%, o preparar 2 gradientes (80 y 40 %) si la muestra contiene menos de 5 Mill/ml.
5. El volumen de las diferentes gradientes de Percoll debe ser de 0.6 ml.
6. Colocar sobre el gradiente de menor concentración (50 ó 40 %) no más de 1 ml de la muestra de semen.
7. Centrifugar a 300g por 20 minutos.
8. Aspirar el gradiente de mayor concentración junto con el pellet y colocarlo e un tubo de centrifuga con 5 ml de medio de cultivo. No descartar los gradientes.
9. Centrifugar por dos veces consecutivas a 500g por 7 minutos y resuspender el pellet en 0.2 ml de medio de cultivo.
10. Si no se encuentran espermatozoides, aspirar la interfase de las gradientes 90-70% ó 80-40%, donde es posible encontrar espermatozoides con algún grado de motilidad. Resuspender esta fracción en medio de cultivo y lavarla por 2 veces por centrifugación a 500g por 7 minutos.



11. Ajustar la concentración final a no más de 1 Millón de espermatozoides/ml y mantenerla en incubadora a 37°C hasta el momento del ICSI.

## **2. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS DESDE BIOPSIA TESTICULAR**

Una vez obtenidas las muestras de la biopsia testicular, éstas se colocan en una cápsula de Petri conteniendo 2 ml de medio de cultivo tamponado con buffer Hepes. La liberación de los espermatozoides de los túbulos seminíferos se realiza por dos portaobjetos estériles. Uno se usa para mantener fijo el tejido testicular, contra el fondo de la cápsula, y el otro para pasar repetidamente, aplicando una pequeña presión, por los túbulos seminíferos con la finalidad de liberar los espermatozoides contenidos en ellos. La presencia de espermatozoides se evalúa bajo el microscopio invertido. Si se observan los espermatozoides en el medio de cultivo, éste se aspira con una pipeta volumétrica y se coloca en un tubo de centrifuga estéril. Terminado el proceso de recuperación de espermatozoides, los tubos se incuban a 37 °C. Antes de la microinyección, los tubos se centrifugan por 2 veces consecutivas a 600g x 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 200 a 300 ml de medio, y 1 ml de esta suspensión se coloca en una gota de 4 ml de medio de cultivo tamponado con Hepes en la cápsula de microinyección. Los espermatozoides con motilidad progresiva nadan hacia la interfase medio de cultivo-aceite mineral desde donde son capturados con la micropipeta de microinyección. Estos espermatozoides son pasados a una gota de PVP donde son inmovilizados y luego microinyectados. Se recomienda realizar la biopsia el día anterior a la obtención de los ovocitos para permitir que los espermatozoides adquieran motilidad durante el cultivo y poder seleccionar los móviles.

Cuando las muestras de espermatozoides están muy contaminadas con glóbulos rojos, existen serias dificultades para capturar los espermatozoides. Esto se puede atenuar hemolizando los glóbulos rojos con una solución de Citrato de Sodio al 0.9% o usando buffer de lisante compuesto por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.155 M,  $\text{KHCO}_3$  0.01 M y EDTA 0.02 M por no más de 5 minutos.

En caso que se observe un número muy reducido de espermatozoides, estos deben recuperarse directamente del material aspirado de la biopsia testicular.

Si se observa que todos los espermatozoides obtenidos son inmóviles, se puede realizar una incubación en una solución hiposmótica de citrato de sodio (test de HOS), eligiéndose para microinyectar aquellos que muestren un grado de hinchamiento en el flagelo.

## **3. PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS PARA EL ICSI**

## A. MATERIALES

Hialuronidasa SIGMA tipo VII, actividad específica de 320 IU/ml.

Medio de cultivo tamponado con Hepes 21 ó 25 mM.

Cápsulas petri Falcon.

Pipetas Pasteur estériles con punta de 1 mm, 300 mm, 150 mm y 120 mm de diámetro.

Aceite mineral equilibrado y probado para embriones.

## B. PROCEDIMIENTO

1. Preparar una solución de Hialuronidasa en medio tamponado conteniendo 80 UI/ml.
2. Preparar una cápsula de doble pocillo, conteniendo en el pocillo central 1 ml de la solución de hialuronidasa, y en el compartimento marginal 2 ml de medio de cultivo.
3. Con la pipeta Pasteur de 1mm, colocar un ovocito, rodeado por su cúmulo, en la solución de hialuronidasa por no más de 15 segundos, pipeteando repetidamente hasta observar que el cúmulo se empieza a soltar.
4. Aspirar el ovocito con la pipeta Pasteur de 300 mm y llevarlo al compartimento marginal, donde se vuelve a pipetear repetidamente hasta que se suelte el resto de cúmulo y luego, llevarlo a una nueva cápsula con medio de cultivo tamponado.
5. Desprender la corona pipeteando con la Pipeta Pasteur de 120 mm.
6. Lavar el ovocito desnudo por 2 veces más en medio de cultivo nuevo.

Este mismo procedimiento de desnudación del ovocito se puede realizar en una cápsula preparada con 5 ó 6 microgotas bajo aceite mineral. La primera gota conteniendo 30 ml de la solución de hialuronidasa y las gotas restantes de 20 ml de medio tamponado, donde se realizan los sucesivos lavados del ovocito. En esta modalidad se puede realizar la desnudación de varios ovocitos a la vez. Para esto se debe preparar, en la misma cápsula, varios set de microgotas, de la misma manera antes descrita.

7. Observar en cada uno de los ovocitos desnudos la presencia del primer corpúsculo polar (Metafase II) y la morfología citoplasmática.
8. Seleccionar para el ICSI sólo los ovocitos en Metafase II y con citoplasma normal y luego guardarlos en incubadora hasta el momento de la microinyección.

- Los ovocitos que no se encuentren en Metafase II se guardan en la incubadora y se pueden volver a examinar en el microscopio 3 ó 4 horas más tarde o hasta el momento del ICSI, para ver si han evolucionado a M-II.

#### **4. PROCEDIMIENTO DE LA MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE**

##### **A. MATERIALES**

1. Microscopio invertido equipado con objetivos de 10 a 40X con contraste de fase modulada de Hoffman y platina termoregulada.
2. Sistema de micromanipulación.
3. Micropipeta para inmovilizar ovocitos con diámetro externo e interno de 100 y 20 mm respectivamente.
4. Micropipeta de microinyección con diámetro externo e interno de 7 y 5 mm respectivamente.
5. Cápsulas Falcon 1006 (50 x 9 mm)
6. Aceite mineral embryo tested.
7. Polivinilpirrolidona (PVP) Sigma, de peso molecular 360,000.
8. Micropipetas automáticas de 1 a 5 ml.
9. Medio de cultivo tamponado con Hepes.
10. Puntas de pipetas estériles.

##### **B. PROCEDIMIENTO**

1. Preparar con al menos 2 días de anticipación PVP al 1% con medio de cultivo tamponado y luego filtrarlo con membrana con poros de 0.8 mm de diámetro.
2. Preparar una cápsula Falcon 1006 (cápsula de microinyección) conteniendo, ya sea: a) dos gotas centrales de 4 ml de PVP al 1% y rodeadas de 4 ó más gotas de 5 ml de medio tamponado con Hepes y luego cubierta con aceite mineral, o b) con 1 set de 4 gotas de 4 ml de PVP al 1% y paralelamente otro set de 4 ó 5 gotas de 5 ml de medio tamponado con Hepes y luego cubierta con aceite mineral.
3. En una gota de PVP, colocar, con ayuda de una pipeta automática, 1 ml de la suspensión de espermatozoides. Las otras gotas de PVP sirven para purgar el aceite mineral de la pipeta de microinyección y/o para inmovilizar los espermatozoides.
4. Colocar en cada gota 5 ml de medio tamponado 1 ovocito desnudo, y luego mantener esta cápsula en incubadora hasta el momento de la microinyección.
5. Montar las micropipetas en el micromanipulador.
6. Colocar la cápsula anteriormente preparada en la platina del microscopio.
7. Bajar la pipeta de microinyección hasta una gota de PVP y purgar el aceite mineral aspirado por capilaridad y dejarla sumergida en la gota de PVP.
8. Elevar levemente la pipeta de microinyección y llevarla a la gota de PVP con espermatozoides.
9. Aspirar suavemente un espermatozoide e inmovilizarlo por sucesivas pasadas

por la punta de la micropipeta o por presión de la cola contra el fondo de la cápsula.

10. Aspirar por la cola al espermatozoide inmovilizado y llevarlo en la punta de la micropipeta hasta una gota conteniendo 1 ovocito, e inmediatamente bajar la micropipeta inmovilizadora de ovocitos.
11. Con esta micropipeta, inmovilizar el ovocito de modo que el corpúsculo polar quede posicionado, en relación a la esfera de un reloj, a las 12 ó 6 horas. Con esta misma relación, acercar a la hora 3 la pipeta de microinyección, con el espermatozoide muy cerca de la punta.
12. Presionar suavemente la zona pelúcida hasta romperla y formar un embudo al presionar la membrana plasmática del ovocito.
13. Aplicar suavemente, con el microinyector, una leve presión negativa hasta que se observe un pequeño salto hacia atrás del espermatozoide (lo que revela la ruptura de la membrana plasmática) y la entrada a la punta de la micropipeta de una pequeña cantidad de citoplasma del ovocito. Inmediatamente después de esto, aplicar una leve presión positiva hasta observar la llegada del espermatozoide al citoplasma del ovocito.
14. Retirar con suavidad la micropipeta del ovocito y soltarlo por leve presión positiva en la pipeta inmovilizadora del ovocito.
15. Los ovocitos microinyectados se lavan en medio de cultivo y luego son transferidos a medio de cultivo de crecimiento e incubados a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.
16. A las 14 ó 18 horas de incubación examinar, en el microscopio invertido, los ovocitos microinyectados para verificar la fecundación por presencia de 2 PN y 2 corpúsculo polars
17. La transferencia embrionaria se realiza a las 48 ó 72 horas de cultivo, luego de realizar la clasificación morfológica de los embriones.

## NUEVAS TÉCNICAS DE MICROMANIPULACIÓN EN *CONCEPTI* HUMANOS

En esta sección nos referiremos a la implementación de técnicas accesorias de micromanipulación de *concepti* humanos.

### A. HATCHING ASISTIDO

El procedimiento de eclosión o *hatching* asistido ha sido aplicado con buenos resultados en pacientes ańosas (>39 ańos) o en aquellas con antecedentes de fallas de implantación reiterada. El *hatching* asistido consiste en practicar una abertura o canal en la zona pelucida para facilitar el escape del *conceptus* una vez que éste ha alcanzado la blastulación. Esta operación puede ser hecha en forma mecánica o química y normalmente se realiza cuando el embrión tiene 8 o más células. El *hatching* mecánico consiste en practicar una perforación tangencial a través de la zona pelucida, en tanto, en el *hatching* químico una solución ácida (ácido Tyrode) se encarga de disolver un segmento de la zona pelucida.

El uso combinado de la técnica de *hatching* con el cultivo a blastocisto puede mejorar significativamente el potencial implantatorio del *conceptus* (Wiemer y col., 1996).

### B. REMOCIÓN DE FRAGMENTOS

En el desarrollo de *concepti* humanos cultivados *in vitro* es frecuente observar la formación de fragmentos interblastoméricos, que carecen de material genético e interfieren con las interacciones celulares entre los blastómeros del *concepti* en desarrollo. Específicamente, los fragmentos dispuestos en las zonas de contacto entre los blastómeros interfieren con el proceso de compactación del *conceptus*. En este proceso morfogénico las células maximizan sus contactos intercelulares y permiten el sellamiento periférico del *conceptus*. Estos últimos procesos son indispensables para que ocurra la blastulación.

Actualmente, el uso combinado del *hatching* asistido con otros procedimientos de micromanipulación permiten remover los fragmentos interblastoméricos producidos, favoreciendo las interacciones celulares e incrementando el potencial de blastulación de *concepti* humanos.

En este procedimiento se realiza primero la disolución parcial de la zona pelucida, con ácido tyrode, para generar un canal por donde, finalmente, se introduce una micropipeta, de calibre apropiado, y se procede a la extracción de los fragmentos depositados entre las células del *conceptus*, mientras éste es sostenido con otra micropipeta por el otro extremo. Esta operación se efectúa, de preferencia, cuando el *conceptus* contiene entre 4 a 8 células.

# **CRIOPRESERVACION DE GAMETOS, CIGOTOS Y CONCEPTI**

## **1. CRIOPRESERVACION DE ESPERMATOZOIDES**

Los procesos vitales requieren de cambios bioquímicos que se llevan a cabo a través del movimiento de moléculas en un medio acuoso. Si el agua dentro y fuera del citoplasma de una célula viva, es convertida en hielo a temperaturas suficientemente bajas para detener el movimiento molecular, y si el sistema biológico puede ser recalentado sin daño, entonces la vida de la célula detenida en este estado de animación suspendida podrá ser preservada.

Spallanzani, en 1776 fue el primero en observar el efecto de la temperatura de congelación en el semen humano, y Montegazza en 1886 el primero en sugerir la idea de los banco para la congelación de espermatozoides humanos. Sin embargo, no fue hasta más tarde que se publicó el éxito de congelación de semen humano con hielo seco, demostrándose que los espermatozoides así congelados, y posteriormente descongelados fueron capaces de fecundar y originar un desarrollo embrionario normal.

### **A. APLICACIONES DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN**

1. Banco de semen (HIV).
2. Pacientes oligoastenozoospermicos.
3. Pacientes que se van a someter a tratamientos quirúrgicos o de quimioterapia.
4. Semen de pareja ausente.

#### **Diluyentes empleados**

Un aspecto de gran importancia es el diluyente o compuestos químicos que forman el diluyente base. Generalmente un diluyente esta formado por la fracción ácida, otra básica y un compuesto que aporte energía a la célula espermática hasta el momento que sea congelada. Todas estas soluciones deben estar a una presión isoosmótica con el plasma seminal, y la combinación de ellas debe mantenerse en un pH neutro.

Los diluyentes deben cumplir unos requisitos de pH, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Deben proporcionar a la célula espermática protección frente a los efectos de la temperatura, refrigeración, congelación y descongelación.

### **B. CRIOPROTECTORES**

Las lesiones debidas a la criopreservación sobre las estructuras celulares pueden atenuarse mediante la inclusión de agentes crioprotectores en la elaboración de los diluyentes. Estas sustancias protegen durante los procesos congelación y descongelación. Numerosas sustancias han sido identificadas por su acción crioprotectora. Los crioprotectores pueden clasificarse en penetrantes (metanol, glicerol, dimetilsulfóxido, etilen glicol, 1-2 propanediol, acetamida) y no penetrantes (azúcares, lipoproteínas de la

yema de huevo y proteínas de alto peso molecular), en función de su permeabilidad para las membranas plasmáticas.

El mecanismo de acción de estos compuestos no es totalmente conocido. Se sabe que los penetrantes se introducen en la célula de forma uniforme, provocando la deshidratación celular por sustitución del agua intracelular y evitando así el incremento de la concentración de solutos y formación de cristales de hielo, siendo más efectivos cuando las velocidades de congelación son bajas. Los no penetrantes se sitúan recubriendo la membrana plasmática e inducen la formación de cristales de hielo alrededor de la misma, siendo más efectivos en congelaciones rápidas.

Los crioprotectores más empleados son el glicerol y la yema de huevo de gallina, la cual debe su efecto protector a las lipoproteínas de baja densidad. El glicerol aunque es ampliamente empleado, presenta ciertos grados de toxicidad para la célula espermática, por ello la concentración de glicerol no debe ser mayor de un 4% - 8%.

### **C. TECNICA**

1. Congelación rápida: Una vez obtenida la muestra en un recipiente estéril, se espera media hora a su licuefacción completa y se realiza un espermograma de control. Se añade la solución crioprotectora (TEST Yolk Buffer-Irvine Scientific) en una proporción 1:1 con respecto al semen y se coloca durante 30 minutos a una temperatura de 2-8 °C en un recipiente con agua. Transcurrido este tiempo, se llenan las pajuelas (0.5 ml) o criotubos (1.0 ml) y se coloca en vapores de nitrógeno (10 cm por arriba del N<sub>2</sub>) durante 10 minutos (algunas personas prefieren dejarlo toda la noche en vapores). Posteriormente se realiza la inmersión dentro del nitrógeno líquido y se ordenan dentro del banco de semen.
2. Congelación programada: El proceso inicial es igual al anterior. Una vez hecha la solución las pajuelas se colocan en la máquina congeladora (Planer), la cual reduce la temperatura a velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas (-0.1C/min a -0.5°C/min), las cuales descienden la temperatura del semen de 30°C a 5°C en períodos de tiempo de una hora. Se sacan las pajuelas y se almacenan en los tanques de nitrógeno líquido. Es un método muy costoso y sólo se justifica si se congela un elevado número de pajuelas.

La descongelación de semen se lleva a cabo a temperatura ambiente. A todas la muestras criopreservadas se les realiza un control para saber el número de espermatozoides móviles posteriores a la congelación.

## **2. CRIOPRESERVACION DE OVOCITOS**

La congelación, almacenamiento y descongelación de ovocitos en un estado que permita la fecundación subsecuente y desarrollo a término, se ha logrado con un éxito muy limitado y variable. Aunque, algunos investigadores (Chen, 1986; Van-huem,1987; Diedrich,1987) han reportado embarazos a término con nacidos vivos a partir de la fecundación *in vitro* de ovocitos humanos descongelados, estos logros no han sido reproducibles y los procedimientos de criopreservación disponibles en la actualidad, no son aún confiables para su uso en la clínica de rutina. Por lo tanto, la posibilidad de almacenar ovocitos en Nitrógeno líquido y recuperarlos intactos, es hoy en día uno de los grandes retos en la tecnología de Reproducción Asistida.

La posibilidad de obtener una progenie viva a partir de ovocitos no fecundados guardados en Nitrógeno líquido, fue demostrada por primera vez en 1977 por Whittingham, con ovocitos de ratón. Desde entonces, se ha aplicado la criopreservación de ovocitos con éxito variable en ratas, monos, hamsters, conejos y humanos (Tsunoda *et al.*, 1976; Whittingham, 1977; Parkening & Chang, 1977; DeMayo *et al.*, 1985; Al-Hasani *et al.*, 1986; Chen, 1988; Vincent *et al.*, 1989). Sin embargo, actualmente no existe un protocolo reproducible que permita la criopreservación de ovocitos con tasas altas de sobrevida y fecundación, como los que han sido publicados para la criopreservación de *concepti* (Veeck *et al.*, 1993).

### **3. CRIOPRESERVACION DE CELULAS EN ESTADO DE PRONUCLEO Y EMBRIONES**

#### **A. MATERIALES**

Equipos:

- Incubadora de CO<sub>2</sub>
- Microscopio estereoscópico
- Campana de flujo laminar
- Máquina de criopreservación
- Tanques para nitrógeno líquido
- Sellador de pajillas
- Balanza automática.

Materiales:

- Cápsulas NUNC de 4 pozos
- Cápsulas Petri (35 x 10 mm)
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de 1, 5, 10 ml
- Frasco de 50 ml
- Filtros de 0.2 mm
- Jeringas de 10 ml



- Cinta para marcar
- Pinzas
- Escalerillas
- Goblets
- Reloj-cronómetro
- Pañuelos desechables

Reactivos:

- PBS estéril (Irvine Scientific)
- Sustituto de Suero Sintético (SSS) (Irvine Scientific)
- 1,2 propanediol (PROH) (Sigma)
- Sacarosa (Sigma, calidad cultivo celular)
- Nitrógeno líquido

## **B. PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN:**

**Solución n° 1 (solución madre):** Preparar 25 ml de PBS suplementado con 20% de SSS, tomando 20 ml de PBS y 5 ml de SSS. Homogeneizar la mezcla.

**Solución n° 2 (PROH 1.5 M):** Colocar 8.9 ml de la solución n° 1 en un tubo cónico de 15 ml y agregar 1.1 ml de PROH. Mezclar bien.

**Solución n° 3 (PROH 1.5 M + sacarosa 0.1 M):** Colocar 8.9 ml de la solución n° 1 en un tubo cónico de 15 ml y agregar 1.1 ml de PROH. Pesar 0.342 gr de sacarosa, agregar y mezclar bien hasta que la sacarosa se disuelva completamente.

Filtrar las soluciones con miliporo de 0.2 mm antes de usar. Las soluciones tienen una duración de 48 h guardadas a 4°C.

### **Procedimiento:**

- Preparar los multipozos. Se puede usar 1 caja hasta para 6 embriones que vayan a ser criopreservados. Identificarla de la siguiente manera:
  - Nombre de la paciente en la parte superior.
  - Pozo N° 1 marcar con PBS (Solución N°1)
  - Pozo N° 2, 3 y 4 marcar con el número correspondiente al embrión y a la solución N° 2.
- Agregar 0.8 ml de PBS al pozo N° 1 y 0.8 ml de la solución N° 2 a los pozos N° 2, 3 y 4. Todas las soluciones deben ser usadas a temperatura ambiente.
- Preparar 1 caja de Petri de 35 mm por cada 4 ó 6 embriones a congelar. Marcarla con el nombre de la paciente y llenarla con 2.0ml de solución N°3.
- Marcar 1 pajilla para cada 2 embriones y purgarla con la solución N° 3.
- Preparar banderillas de cinta para cada pajilla. Marcarlas con el nombre de la paciente, fecha, número de embriones congelados y números de la pajilla correspondiente.
- Preparar la máquina de congelar. Llenar a un 70 - 90% el tanque con Nitrógeno líquido.

Colocar la bomba dentro del tanque y asegurarse que este bien sellado. Prender la máquina y encender el botón de la plataforma para que la presión empiece a subir. Una vez alcanzada la presión adecuada (5.0 lbs), entrar al programa y esperar que alcance la temperatura inicial (16°C).

### **C. PROTOCOLO DE CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO:**

1. Colocar los embriones que clasificaron para ser congelados en el pozo que contiene Solución N°1 (PBS + 20% SSS) a temperatura ambiente para lavar rápidamente.
2. Transferir los embriones a la Solución N°2 (1.5M PROH en PBS+20% SSS) por 10 minutos. Empezar a medir el tiempo con el primer par de embriones transferidos y llevar el registro para cada embrión.
3. Transferir los embriones a la caja de petri de 35mm con la Solución N°3 (1.5M PROH + 0.1M Sacarosa). Todos los embriones deben hundirse hasta el fondo de la caja (aproximadamente 1 minuto). Cuando se congela en estado de pronúcleos se debe prolongar un poco este tiempo (aproximadamente 2 minutos) antes de montar las pajillas.
4. Conectar la pajilla con la jeringa de 1.0 ml y purgar con la Solución N°3. Introducir la pajilla nuevamente en esta solución y succionar entre 1.0 a 1.5 cm, hacer una burbuja de aire de más ó menos 0.3 cm, succionar nuevamente solución y tomar los embriones (3.0 cm), hacer burbuja de aire de 0.3 cm y nuevamente solución (1.0 cm). Llevar la columna de fluido hasta el extremo con PVA y sellar la pajilla con calor. Marcar cada pajilla con su banderilla correspondiente y colocarlas en posición vertical dentro de la cámara de congelación.
5. Una vez estén todos los embriones colocados en la cámara, iniciar el programa presionando el botón “RUN” en el panel del computador.
6. El programa de congelación requiere hacer el *seeding* (cristalización) manual a -8.0°C. Tomar unas pinzas metálicas enfriadas en nitrógeno líquido, elevar la pajilla por la banderilla (sin sacarla totalmente de la cámara) y con las pinzas hacer contacto directo sobre el borde de la primera burbuja de aire hasta que se vea la solución cristalizada, inmediatamente colocarla de nuevo en la cámara. Repetir este procedimiento en todas las pajillas y al finalizar, presionar “RUN” para que el programa continúe.
7. Mientras el programa esta corriendo, completar toda la información en los registros y marcar los goblets y escalerillas con nombre de la paciente, fecha y número de embriones congelados.
8. Al finalizar la congelación, enfriar los goblets fijados en las escalerillas dentro de un

termo con Nitrógeno líquido. Remover rápidamente las pajillas de la cámara y guardarlas dentro de los goblets, llenar el espacio vacío con papel y transferir al tanque de almacenamiento, anotar el sitio de almacenamiento en el registro de la paciente.

9. Presionar “RUN” para que la máquina vuelva a su temperatura inicial y sacar la presión de Nitrógeno líquido de la cámara. Cuando este haya llegado a 0.0 lbs, sacar la bomba y tapar el tanque.

#### **D. PROGRAMA PARA LA MÁQUINA DE CONGELACIÓN:**

- Temperatura inicial 16.0°C.
- Rampa 1: -2.0°C por minuto hasta -8.0°C.
- Rampa 2: -8.0°C por 5 minutos para equilibrar. Hacer el *seeding* manual y luego sostener la temperatura por 5 minutos más.
- Rampa 3: -0.3°C por minuto hasta -30.0°C.
- Rampa 4: -50.0°C por minuto hasta -150.0°C.
- Duración del programa aproximadamente de 2 horas.

#### **4. DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES**

Las condiciones de descongelación son fundamentales para la supervivencia de los embriones criopreservados. Las pajuelas retiradas del tanque de Nitrógeno líquido deben ser mantenidas a temperatura ambiente durante 40 segundos antes de ser colocadas en baño de agua (30 °C). El primer paso (mantener las pajuelas a temperatura ambiente) reduce la posibilidad de daño de la pajuela y el segundo minimiza el tiempo en el cual los cristales de hielo pudiesen crecer, lesionando las células.

El proceso de descongelación y retiro del crioprotector se logra bajando las diluciones de PROH gradualmente en presencia de sacarosa. La sacarosa mantiene el gradiente osmótico extracelular que previene la entrada de agua excesiva durante el retiro del crioprotector. Cuando el crioprotector ha salido completamente, el embrión se coloca en el medio de cultivo y el agua retorna dentro de la célula.

#### **A. Equipos, Materiales y Reactivos:**

Equipos:	Incubadora de CO <sub>2</sub> .
	Microscopio-estereoscópico.
	Cámara de Flujo Laminar.
	Balanza analítica.

**Materiales:**

- Cajas de Petri de 35x10 mm.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de 10ml, 5.0ml y 1.0ml
- Frasco de 50ml.
- Filtros de 0.2 mm.
- Jeringas de 10ml.
- Tubos Cónicos graduados
- Jeringa de 1.0ml.
- Pinzas.
- Reloj-cronómetro.
- Cajas Multipozos.
- Pañuelos desechables.
- Tijeras.
- Termómetro.
- Vaso precipitado.

**Reactivos:**

- PBS Dulbecco's estéril (Irvine Scientific)
- Suero Sintético Sustituto (Irvine Scientific).
- 1-2 Propanediol - PROH (Sigma).
- Sucrosa - cultivo celular (Sigma).

### **B. Preparación de los medios de descongelación:**

**Solución N°1:** Preparar solución madre al 20% de Suero Sintético Sustituto (SSS). 20 ml de PBS más 5.0 ml de SSS. Homogenizar la solución.

**Solución N°2:** Agregar 9.25 ml de la Solución N°1 dentro de un tubo cónico y adicionar 0.75 ml de PROH, mezclar muy bien. Esta solución es 1.0 M PROH.

**Solución N°3:** Pesar 0.342 gr de sacarosa en un tubo cónico y agregar 5.0 ml de la Solución N°2. Mezclar muy bien hasta que la Sacarosa se disuelva completamente. Esta solución es 1.0 M PROH + 0.2 M Sacarosa.

**Solución N°4:** Diluir la Solución N°2 agregándole 5.0 ml de la Solución N°1. Esta solución es 0.5 M PROH.

**Solución N°5:** Pesar 0.342 gr de Sacarosa en un tubo cónico y agregar 5.0ml de la Solución N°4. Mezclar muy bien hasta que la Sacarosa se disuelva completamente. Esta solución es 0.5M PROH + 0.2M Sacarosa.

**Solución N°6:** Pesar 0.342 gr de Sacarosa en un tubo cónico y agregar 5.0 ml de la Solución N°1. Esta solución es 0.2 M Sacarosa.

Filtrar las soluciones antes de usar en tubos cónicos nuevos.

Las soluciones pueden ser usadas hasta 48 horas después de preparadas si se almacenan a 4°C.

### **Procedimiento:**

- Preparar los multipozos- 1 caja por cada pajilla que se va a descongelar. Identifíquela de la siguiente manera:
  - Nombre de la paciente en la parte superior.
  - Pozo N°1 marcar con 1.0M PROH + 0.2M Sacarosa ( Sol. #3)
  - Pozo N°2 marcar con 0.5M PROH + 0.2M Sacarosa.(Sol. #5)
  - Pozo N°3 marcar con 0.2M Sacarosa.(Sol. #6)
  - Pozo N°4 marcar con PBS con 20% SSS (Sol #1)
- Agregar 0.8ml de cada solución en su correspondiente pozo. Todas las soluciones deben ser usadas a temperatura ambiente.
- Preparar un tubo Falcon de 6.0 ml por cada pajilla que se va descongelar. Marcar con el nombre de la paciente y número de la pajilla. Agregar 1.0 ml de Solución N°1.

### **C. Protocolo de descongelación:**

1. Preparar en el vaso de precipitado el agua a 30°C.
2. Llenar un termo con Nitrógeno líquido y transferir el goblet que contiene los embriones que se van a descongelar (mantener siempre el nivel de N<sub>2</sub> líquido por encima del *goblet*).
3. Remover la pajilla del Nitrógeno líquido y empezar a medir del tiempo. (Sostener la pajilla con unas pinzas metálicas para evitar la transferencia de calor). Descongelar la pajilla a temperatura ambiente por 30 segundos. Limpiar la escarcha con un pañuelo desechable y confirmar la integridad de la pajilla.
4. Sumergir la pajilla en el agua a 30°C por 40 a 50 segundos, sin agitar.
5. Remover y secar suavemente con un pañuelo desechable el exceso de agua. Cortar con las tijeras el extremo que fue sellado con calor, empujar con la jeringa de 1.0 ml y cortar el extremo que viene sellado de fabrica. Suavemente expulsar los embriones en el pozo N°1 (1.0 M PROH + 0.2 M Sacarosa) y dejarlos por 5.0 minutos. Si los embriones no se ven, lavar la pajilla suavemente varias veces con la solución hasta que los embriones se recuperen.

6. Transferir los embriones al pozo N°2 (0.5 M PROH + 0.2 M Sacarosa) por 5.0 minutos.
7. Transferir los embriones al pozo N°3 (0.2 M Sacarosa) por 10 minutos.
8. Transferir los embriones al pozo N°4 (PBS + 20% SSS) por 10 minutos.
9. Transferir los embriones al tubo Falcon de 6.0 ml con PBS + 20% SSS, cerrar la tapa herméticamente y guardar en la incubadora a 37°C por 10 minutos.
10. Transferir los embriones a medio de cultivo gasificado y permitir el equilibrio en incubadora por mínimo 30 minutos antes de la transferencia. Cuando se descongela en estado de 2 PN se debe dejar en cultivo toda la noche para hacer la clasificación embrionaria antes de transferir.
11. Almacenar toda la información en el registro de la paciente.

## 5. PROTOCOLO DE CRIOPRESERVACIÓN ULTRARAPIDO (Vitrificación)

### A. MATERIALES

- Medio de Cultivo suplementado con 20% de Suero.
- DMSO (Sigma D2650).
- Sacarosa (Sigma S1888).
- Pajuela de 0.25 ml.
- Sellador.
- Pipeta de 1 ml.
- Cápsula de 60 x 15 mm.
- Tubos de centrifuga de 15 ml
- Jeringas de 1 ml.
- Filtro de miliporo de 0.22.

### Soluciones

#### **i) Solución de Criopreservación**

DMSO 3M + Sacarosa 0.25 M. Preparar esta solución en la víspera de la transferencia de embriones en fresco.

**a. Solución de Cultivo**

Mezclar 4 ml de MC con 1 ml de suero.

**b. Solución de DMSO 3M**

Agregar 1.065 ml de DMSO a 3.935 ml de Solución de Cultivo.

- c. Pesar 0.4278 gr de sacarosa y colocar en un tubo de 15 ml. Completar a 5 ml con solución DMSO 3M, obteniéndose una solución final de DMSO 3M + 0.25 M de Sacarosa.

Filtrar la solución final en filtro con membrana de 0.22 mm y gasificar con una mezcla gaseosa de 90% N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 5 de O<sub>2</sub>. Mantener la temperatura. Se debe almacenar a 4°C por un periodo mínimo de 24 horas y máximo de 72 horas.

**ii) Soluciones de Descongelación**

Preparar estas soluciones el día de descongelamiento.

**a. Solución de Cultivo**

Agregar 2 ml de suero a 8 ml de MC. Filtrar esta solución con membrana de 0.22mm y mantener a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> por un periodo mínimo de 2 horas.

**b. Solución Madre**

Pesar 0.4278 gr de Sacarosa. Colocar en un tubo graduado de 15 ml. Completar a 5 ml con solución de cultivo, obteniéndose así una solución final de sacarosa 0.25 M. Filtrar con membrana de 0.22 mm y gasificar con mezcla gaseosa de de 90% N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub> y mantener a temperatura ambiente.

- *Solución de Descongelamiento 1*

2 ml de solución madre + 1 ml de solución de cultivo.

- *Solución de Descongelación 2*

1 ml de solución madre + 1 ml de solución de cultivo.

- *Solución de Descongelación 3*

1ml de solución madre + 2 ml de solución de cultivo.

**B. PROCEDIMIENTO**

**i) Congelación**

Retirar la solución de criopreservación del refrigerador y dejarla a temperatura ambiente por un periodo mínimo de 30 minutos.

Transferir los embriones con el mínimo de medio posible. Dejar los embriones en la solución de congelación por 2.5 minutos. Durante este periodo los embriones son colocados dentro de las pajuelas (0.25 ml), previamente identificadas con el nombre de la paciente.

Luego, las pajuelas son selladas en las extremidades con sellador en polvo o por calor.

Después de este periodo exacto, las pajuelas conteniendo 1 a 3 embriones son sumergidas directamente en Nitrógeno líquido.

## ii) Descongelación

Las pajuelas son descongeladas en un baño de agua a 30°C durante 6 segundos. En seguida, se cortan las extremidades selladas de la pajuela para dejar caer el contenido con los embriones descongelados en las soluciones de descongelación en la siguiente secuencia: Solución de Descongelación 1, Solución de Descongelación 2 y Solución de Descongelación 3. Los embriones son mantenidos durante 10 minutos en cada solución a temperatura ambiente en un sistema gasificado (90% N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>).

Después de la última solución, los embriones son lavados varias veces en medio de cultivo y mantenidos a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

Luego de un periodo mínimo de 24 horas, los embriones son transferidos a la paciente.



## REFERENCIAS

- Al-Hasani S, Tolksdorf A, Diedrich K, Van der Ven H & Krebs D. (1986). Successful in vitro fertilization of frozen-thawed rabbit oocytes. *Hum.Reprod.* 1:309-312.
- Ben-Chetrit A, Jurisicova A & Casper RF. (1996). Co-culture with ovarian cancer cell enhances human blastocyst formation in vitro. *Fertil Steril.* 65:664-666.
- Chen C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* i: 884-886.
- De Mayo FJ, Rawlins RG & Dukelow WR. (1985). Xenogeneous and in vitro fertilization of frozen/thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos. *Fertil.Steril* 43:295-300.
- Diedrich K, Al-Hassani S, Van der Ven H & Krebs D. (1987). Successful in vitro fertilization of frozen thawed rabbit and human oocyte.  
J. In Vitro Fert. Embryo Transfer 3: 65-69.
- Dirnfeld M, Goldman S, Gonen Y, Koifman M, Calderon I & Abramovici H. (1997). A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertil. Steril.* 67:120-122.
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schelenker T & Schoolcraft WB. (1998). Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers.  
*Fertil. Steril.* 69: 84-88.
- Lai YM, Chang MY, Chang FH, Lee CL, Lee JD, Chang SY, Huang HY, Wang ML, Chan PJ & Soong YK. (1996). The effects of Vero cells co-culture on human zygotes resulting from in vitro fertilization and oocytes following subzonal insemination. *Chang Keng I Hsueh* 19: 203:210.
- Parkening TA & Chang MC. (1977). Effects of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. *Biol. Reprod.* 17: 527-531.
- Tsunoda Y, Parkening TA & Chang MC. (1976). In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experientia* 32: 223-224.
- Van Huem JH, Siebzehnuebl ER, Koch R, Trotnow S & Lang N. (1987). Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* i: 752-753.
- Veeck LL, Maloney MR, Amundson CH, Muasher SJ, Brothman LJ, Jones HWJ & Desciscuolo C. (1993). Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil. Steril.* 59: 1202-1207.

Ventruba P, Zakova J, Adlen J, Trarmik P, Komarkova J & Nemcova S. (1996). Prolonged culture of human embryos: comparison of co-culture on human tubal epithelium and culture in synthetic media. *Ceska Gynekol* 61: 351-357

Vincent C, Garnier V, Heyman Y & Renard JP. (1989). Solvent effects on cytoskeletal organization and in vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 87: 809-820.

Whittingham D. (1977). Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *J.Reprod. Fertil.* 49: 89-94.

## **PROVEEDORES**

### **COOK OB/GYN (USA)**

Teléfono: (812)-829-6500  
Fax: (812)-829-2022

### **HUMAGEN (USA)**

Teléfono: 804-979-4000  
Fax: 804-295-5912

### **IRVINE SCIENTIFIC (USA)**

Teléfono: (800)-577-6097  
Fax: (714)-261-6522  
Servicio Técnico: (800)-437-5706

### **IVF SCIENCE (SUECIA)**

Teléfono: 46 31 50 50 84  
Fax: 46 31 40 54 74  
E.mail: info@sivfs.se

### **JCD (FRANCIA)**

Teléfono: (33) 02 33 24 47 80  
Fax: (33) 02 33 34 34 87

### **LABORATOIRE CCD (FRANCIA)**

Teléfono: (33) 1 44 95 14 95  
Fax: (33) 1 44 95 14 90

### **MEDICULT (DINAMARCA)**

Teléfono: +45 39 27 15 22  
Fax: +45 39 27 15 33  
E-mail: medi-cult@internet.dk

### **SIGMA (USA)**

Teléfono: (314)-771-5750  
Fax: (314)-771-5757  
E-mail: custserv@sial.com  
Internet: <http://www.sigma.sial.com>

### **TS SCIENTIFIC**

Teléfono: (215) 257-4756  
Fax: (215) 257-6046