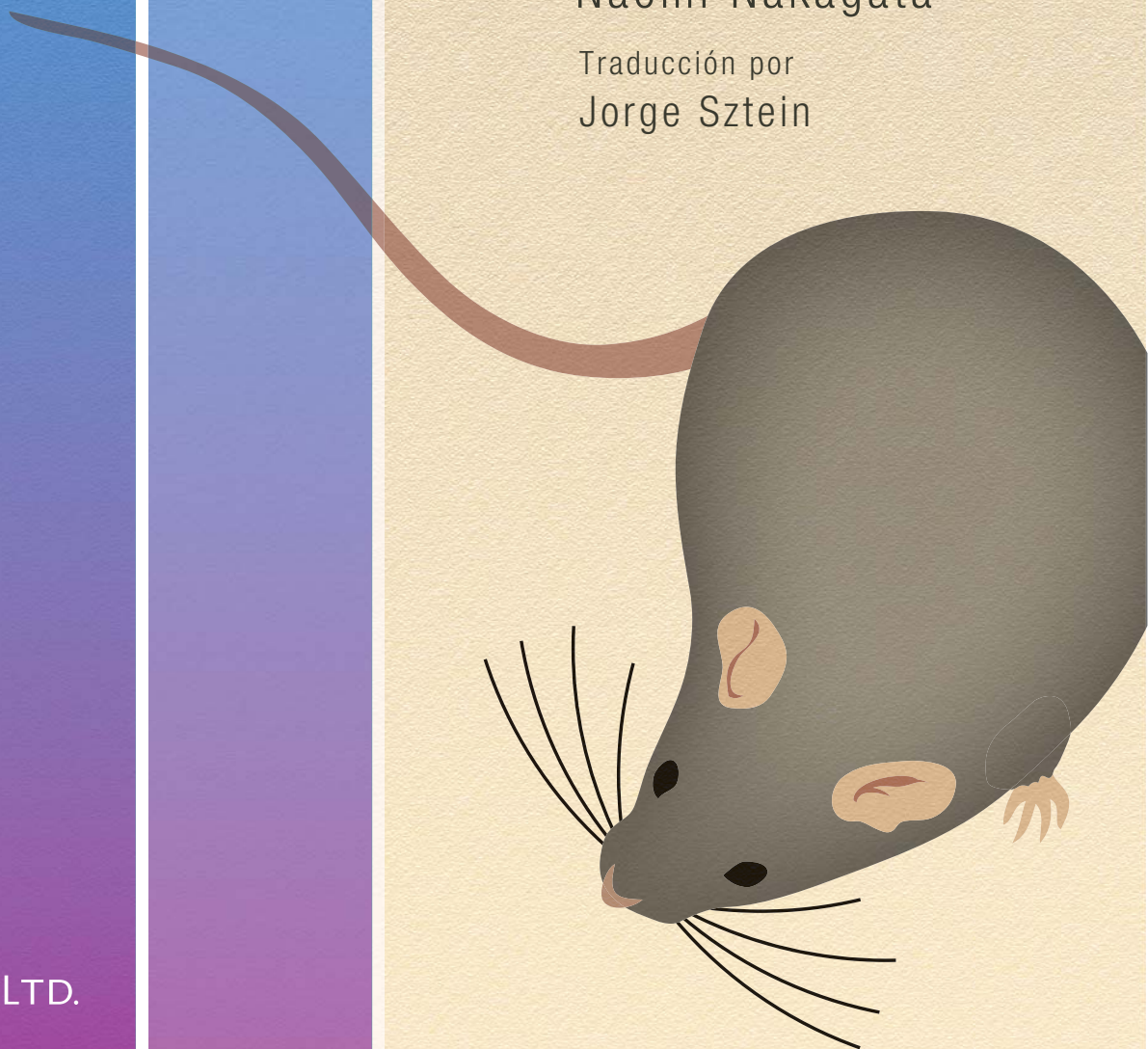


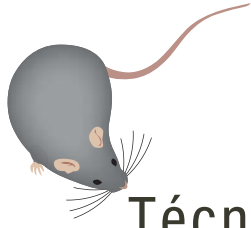
Técnicas de Ingeniería Reproductiva del Ratón

Manual Técnico

Naomi Nakagata

Traducción por
Jorge Sztein





Técnicas de Ingeniería Reproductiva del Ratón

Manual Técnico

Por Naomi Nakagata

En colaboración con Shuuji Tsuchiyama

División de Ingeniería Reproductiva

Centro de Recursos Animales y Desarrollo (CARD)

Universidad de Kumamoto, Japón

Traducción por Jorge Szein

Corrección por Josep Marimon

3ra edición, Publicado por COSMO BIO CO., LTD.

Toyo-Ekimae Bldg., 2-20, Toyo 2-Chome, Koto-Ku, Tokio 135-0016

Japón

Tel: +81-3-5632-9617

Diseño de Tapa COSMO BIO CO., LTD.

Copyright©2015 Naomi Nakagata , Todos los derechos Reservados.

Impreso en Japón. No está permitida la venta de este libro

No está permitida la reproducción parcial o total de este documento,

copiar en un sistema de recuperación o transmisión en cualquier

forma o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopias,

grabaciones o por cualquier otro método, sin autorización previa del

titular de los derechos de autor.

Introducción

El número de ratones genéticamente modificados producidos en los últimos años ha incrementado dramáticamente. Por otra parte, ha sido notable el rápido progreso en el desarrollo de nuevas técnicas destinadas a la edición del genoma (TALEN y CRISPR/Cas9) en estudios de biología molecular, de manera tal que un ratón genéticamente modificado puede producirse fácilmente en un tiempo relativamente corto. Esta producción ha sido apoyada por técnicas de reproducción como la fertilización in vitro, la criopreservación de embriones, de espermatozoides y las técnicas de transferencia embrionaria. Estas técnicas se han convertido en inestimables métodos periféricos y su uso se ha popularizado rápidamente.

La rápida popularidad alcanzada, ha provocado la publicación de varios manuales técnicos relacionados con la tecnología de la reproducción del ratón (como este mismo). Sin embargo, aun no ha sido publicado un manual con suficiente detalle dado que las técnicas de reproducción asistida del ratón involucran mayoritariamente delicadas operaciones bajo un microscopio estereoscópico.

Con ese objetivo en mente, en este libro hemos tratado de crear un manual sobre las técnicas reproductivas del ratón que pueda ser fácilmente comprendido por todos. En nuestro manual hemos incluido un número generoso de diagramas, fotografías y videos para explicar paso a paso cada técnica en la forma más clara y minuciosa que hemos podido. Sinceramente deseamos que nuestro manual se convierta en una guía definitiva para estudiantes, técnicos, investigadores y otras personas que desean estudiar las técnicas de reproducción asistida en ratón.

Naomi Nakagata

CONTENIDO

Capítulo 1 Fertilización *in vitro* (FIV)

- 1-1 Preparación y ensamblado de pipetas para manipular embriones 4
- 1-2 Fertilización *in vitro* (FIV) 6
- 1-3 Fertilización *in vitro* (FIV) usando el reactivo para ultra-superovulación12

Capítulo 2 Transporte de espermia

- 2-1 Recolección y transporte en frío de la cola (Cauda) del epidídimo 14
- 2-2 Fertilización *in vitro* usando espermia del epidídimo transportado en frío 18

Capítulo 3 Criopreservación de espermia

- 3-1 Criopreservación de espermia de ratón 20
- 3-2 Fertilización *in vitro* usando espermia criopreservado 26
- 3-3 Método de fertilización *in vitro* para el rescate de un stock legado de espermia criopreservado 32

Capítulo 4 Preparación de los ovocitos y embriones

- 4-1 Preparación de ovocitos micro-diseccionados con laser 36
- 4-2 Disección parcial de la zona pelúcida (DPZ) 39
- 4-3 Recolección de embriones en estadio de 2-Celulas 42

Capítulo 5 Transporte de ovocitos y embriones

- 5-1 Transporte en frío de embriones a 2-células 46
- 5-2 Transporte en frío de oviductos de ratón con embriones a 2-células 52

Capítulo 6 Criopreservación de ovocitos y embriones

- 6-1 Vitrificación simple de embriones de ratón 54
- 6-2 Vitrificación simple de ovocitos de ratón 59
- 6-3 Vitrificación y trasplante de ovarios de ratón 62

Capítulo 7 Otras técnicas

- 7-1 Vasectomía para la obtención de machos estériles 64
- 7-2 Transferencia Embrionaria en Oviducto 66
- 7-3 Transferencia Embrionaria en Útero 72
- 7-4 Cesárea y adopción 76

Capítulo 8 Medios

- 8-1 Almacenamiento de medios y soluciones en ampollas con gas de nitrógeno 78
- 8-2 Tabla de composición de los medios 79

*  Por favor, para más información consulte la página 90.

1-1 Preparación y ensamblado de pipetas para manipular embriones

Materiales y equipo

1. Pipetas capilares de vidrio (Calibrated Micropipettes; 2-000-200; Drummond Scientific Company, USA)
2. Mechero de alcohol (o mechero Bunsen recto de laboratorio; Cat. No. RK4102; REKROW INDUSTRIAL INC.)
3. Lápiz de diamante o cortador de ampollas de vidrio
4. Hemocitómetro
5. Pipeta pasteur
6. Algodón
7. Tubo de silicona
8. Tapón de silicona
9. Boquilla

Procedimientos

Limpieza y esterilización de pipetas capilares de vidrio

1. Sumerja las pipetas capilares de vidrio en una solución de 99:1 de 70% etanol y ácido clorhídrico concentrado durante más de 12 horas.
2. Enjuague las pipetas bajo agua corriente durante no menos de 3 horas.
3. Enjuáguelas 4 o 5 veces con agua destilada.
4. Esterilice los capilares de vidrio por calor seco a 180°C durante 3 horas.

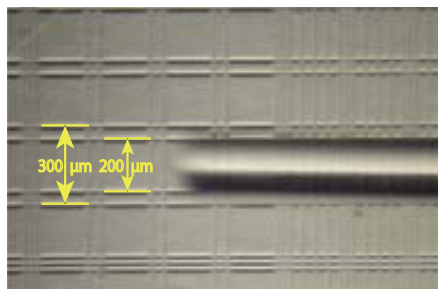
Elaboración de pipetas para la manipulación del embrión

1. Caliente en la zona alta de la llama de un mechero de alcohol en la parte central de un capilar de vidrio. Cuando el vidrio del capilar este lo suficientemente blando, retírelo de la llama y rápidamente tire de los dos extremos.
2. Divida los capilares en dos poniendo el centro de la sección afinada nuevamente sobre la llama.
3. Evalúe la sección afinada y usando un cortador de ampollas corte las pipetas de una longitud apropiada (10 cm) y elimine la parte sobrante.
4. Controle el diámetro del extremo del capilar bajo un microscopio usando un hemocitómetro.

[Cuando el borde del capilar esta en foco]



[Cuando el hemocitómetro está en foco]



[Elaboración de pipetas para manipular embriones] No. 01-01



Nota

Las pipetas capilares para manipulación embrionaria ya ensambladas están disponibles en Cosmo Bio Co., Ltd. (Embryo manipulation instrument set, Cat. No. KYD-S036)

Nota

Las dimensiones de los capilares dependerán tanto de la temperatura a la que se someta el vidrio como del periodo de tiempo en que se tira del capilar.

Con práctica, se dominará la técnica y podrá convertir los capilares en pipetas de las dimensiones requeridas

El diámetro externo de las pipetas producidas debe ser aproximadamente de 200-250 μm.

5. Pula y esterilice la punta de la pipeta calentándola suavemente sobre la llama. Tenga cuidado de no sobrecalentar la punta del capilar ya que puede cerrar la abertura.

[El extremo del capilar antes de pulirlo]



[La pipeta con la punta pulida]



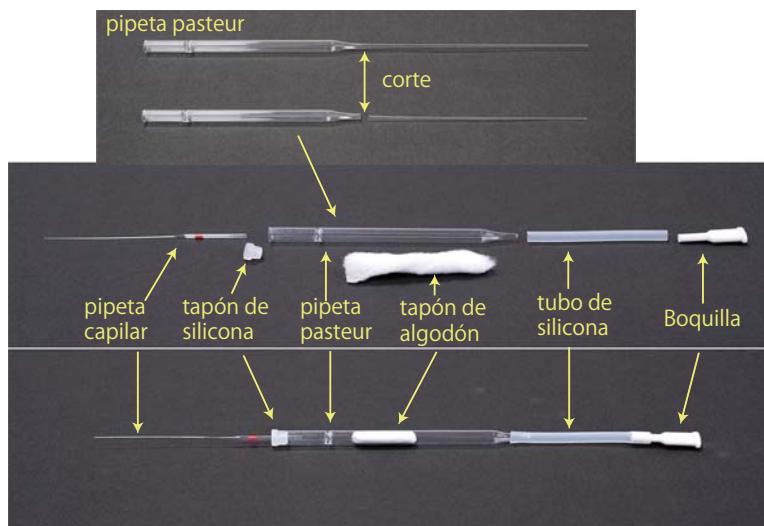
[Pulido de la punta de la Pipeta de vidrio] No. 01-02



Ensamblado de la pipeta de transferencia para manipulación de embriones

1. Corte la punta fina de una pipeta Pasteur con un cortador de ampollas (dejando aproximadamente 1 cm).
2. Use la llama de un mechero de alcohol para pulir la punta cortada.
3. Inserte un algodón dentro de la pipeta.
4. Coloque el tapón de silicona en el extremo de la pipeta con boca ancha.
5. Conecte un tubo flexible de goma en el extremo fino de la pipeta.
6. Corte el tubo de goma de una longitud que sea cómodo para su uso, e inserte la boquilla en el otro extremo.

[Pipeta de transferencia y manipulación de embriones]



Como manipular los embriones

1. Coloque la boquilla de la pipeta de transferencia en su boca.
2. Observando bajo un microscopio, introduzca la punta del capilar en la gota de medio. Deje que el medio llene la punta de la pipeta; esto se produce por un fenómeno natural llamado capilaridad.
3. Cuando la capilaridad se termine, use la boquilla para succionar los embriones dentro del capilar solo aspirando, para liberarlos exhale suavemente.

[Como manipular los embriones] No. 01-03



1-2 Fertilización *in vitro* (FIV)

Materiales y equipo

1. PMSG (Gonadotropina sérica de yegua preñada, Cat. No. 80056-608; VWR SCIENTIFIC INC.) (37.5 IU/mL en solución fisiológica estéril)
2. hCG (Gonadotropina Coriónica humana, CG-10; Sigma) (37.5 IU/mL en solución fisiológica estéril)
3. Jeringas descartables de 1 mL
4. FERTIUP® (medio de pre-incubación: PM, Cat. No. KYD-002-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. MEDIO CARD® (CARD MEDIUM® Cat. No. KYD-003-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
6. mHTF
7. Aceite mineral
8. Micropipetas
9. Puntas de pipeta para preparar las placas
10. Puntas de pipeta para inseminación (Pipette Tip Cat. No. 114; Quality Scientific Plastics)
11. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
12. Tijeras de disección
13. Pinza de relojero #5
14. Tijeras de micro-disección con muelle (hoja de 5 mm)
15. Aguja de disección
16. Papel de filtro
17. Pipetas capilares de vidrio para la manipulación del embrión
18. Microscopio
19. Estufa de incubación humidificada (37°C , 5% CO₂ en aire)

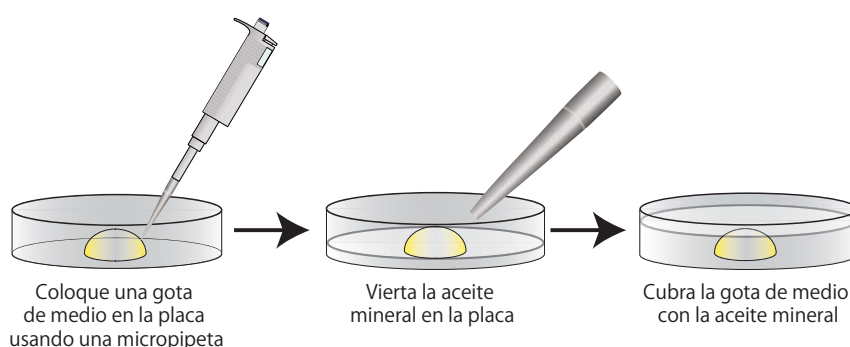
Procedimientos

Superovulación

1. Inducir la superovulación inyectando 7.5 IU i.p. de la gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) en cada ratón hembra madura (8-12 semanas). (La PMSG usualmente se administra durante el ciclo de luz, entre las 14:00 y las 18:00 horas).
2. Seguidamente, 48-52 horas más tarde se inyectan 7.5 IU i.p. de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG).

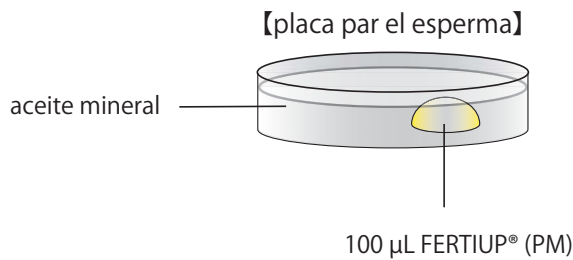
Preparación de las placas

1. Prepare las placas como se muestra debajo y manténgalas en la estufa (37°C , 5% CO₂ en aire) para permitir que se equilibren con el gas.



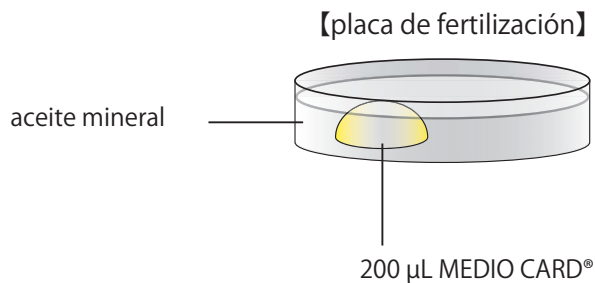
a. Placa de esperma

Coloque 1 gota (100 μL / gota) de FERTIUP® (PM) en una placa y cúbrala con la aceite mineral 30 minutos antes de recolectar el esperma; coloque la placa en el incubador.



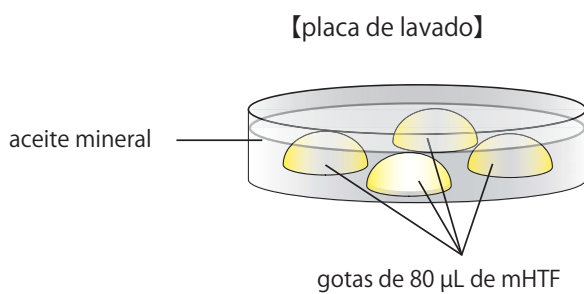
b. Placa de fertilización

Ponga 1 gota (200 μL / gota) del MEDIO CARD® en una placa y cúbralo con aceite mineral 10 minutos antes de recolectar los ovocitos, coloque la placa en el incubador.



c. Placa de lavado

Coloque 4 gotas (80 μL / gotas) de mHTF en una placa y cúbrala con aceite mineral. Ponga la placa en el incubador al menos por 30 minutos.

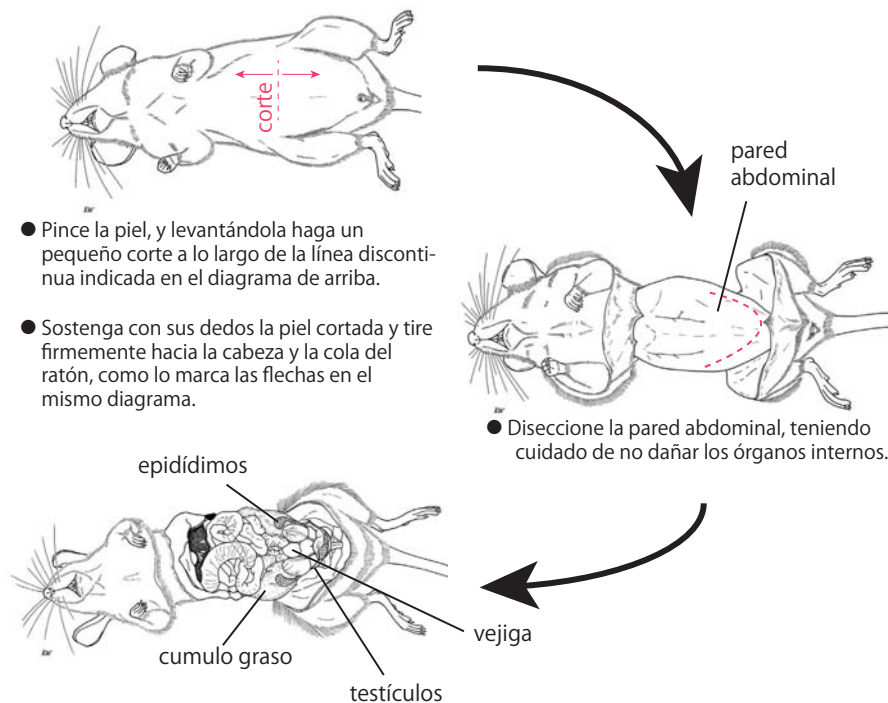
**Nota**

Hay tres métodos distintos de preparar el MEDIO CARD®, dependiendo si la fertilización *in-vitro* se hará usando esperma fresco, congelado y descongelado o esperma transportado en frío.

Por favor consulte las instrucciones del MEDIO CARD®.

Recolección de espermia

1. Sacrifique 1 or 2 ratones machos adultos (de 3 a 6 meses) y saque las colas de los epidídimos evitando al máximo posible la grasa, sangre y fluidos.
2. Coloque el organo sobre un papel filtro estéril para absorber toda sangre o fluidos.



- Pince la piel, y levantándola haga un pequeño corte a lo largo de la línea discontinua indicada en el diagrama de arriba.

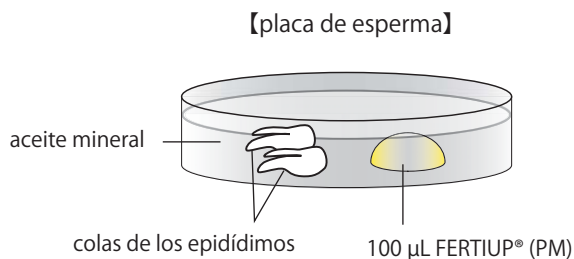
- Sostenga con sus dedos la piel cortada y tire firmemente hacia la cabeza y la cola del ratón, como lo marca las flechas en el mismo diagrama.

- Diseccione la pared abdominal, teniendo cuidado de no dañar los órganos internos.

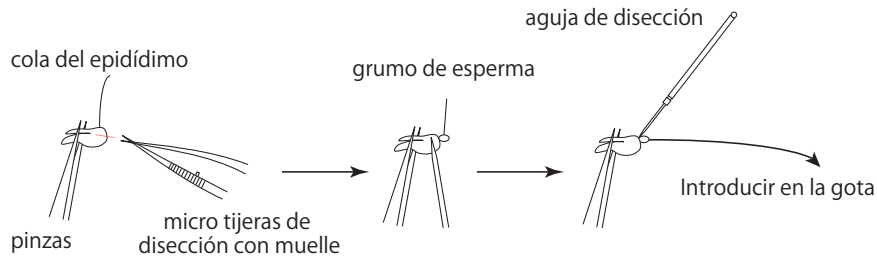
[Extrayendo las colas de los epidídimos] No. 02-01



3. Coloque las colas de los epidídimos en la paca de espermia cubierta de aceite mineral.



4. Corte el conducto de cada cola del epidídimo usando unas micro-tijeras con muelle, después use una aguja de disección para presionar suavemente la superficie del epidídimo para forzar la salida del espermia.
5. Use la aguja de disección para introducir los grumos de espermia liberados del epidídimo en la gota de FERTIUP® (PM).

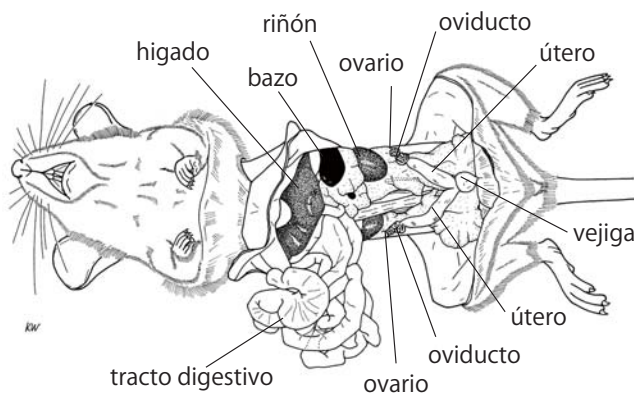


[Recolección de espermia] No. 02-02 

- Deje capacitar el espermia colocando la suspensión en un incubador (37 °C , 5% CO₂ en aire) durante 60 minutos previos a la inseminación.

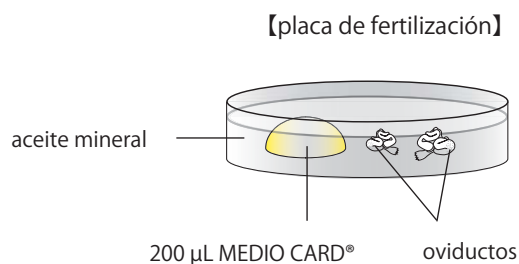
Recolección de ovocitos

- Sacrifique una hembra adulta (8-12 semanas) superovulada aproximadamente entre las 15-17 horas después de administrarle la hCG.
- Disecione el ratón abriendo la cavidad abdominal.
- Mueva a un lado el tracto digestivo para exponer el útero, oviductos y ovarios.
- Extraiga el útero, oviducto y ovarios y colóquelo sobre un papel filtro estéril.
- Retire solo los oviductos (ámpulas), evitando en lo posible la grasa, sangre y fluidos.



[Diseción del oviducto] No. 02-03 

- Sumerja los oviductos en la aceite mineral de la placa de fertilización.



Nota

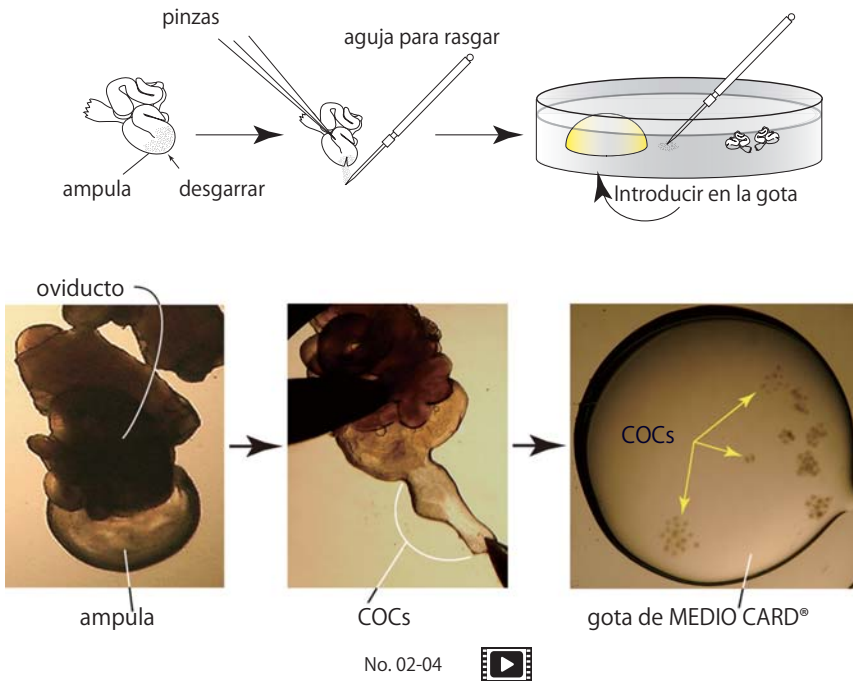
El grado de fertilidad variara en gran medida dependiendo del espermia utilizado.

El espermia con niveles altos de fertilidad puede observarse moviéndose en vórtice con gran motilidad en los bordes del medio de incubación.

Por el contrario, el espermia que muestra baja motilidad y pobre homogeneidad tiende a tener bajos niveles de fertilidad.

- Use un par de pinzas para mantener fijo el oviducto en el fondo de la placa de fertilización, y use una aguja de disección para desgarrar y abrir la ampulla del oviducto para liberar los complejos cúmulo-ovocitos (COCs). Arrastre los cúmulos dentro de la gota de MEDIO CARD® (200 µL).

[Introduciendo el complejo cúmulo-ovocito (COCs) en la gota de MEDIO CARD®]



Nota

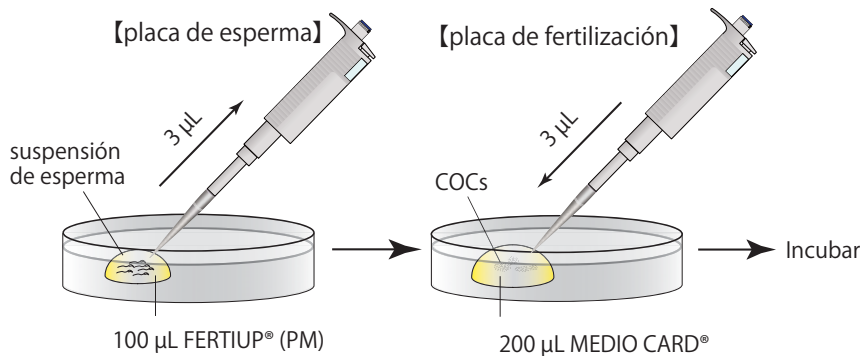
Asegúrese de llevar a cabo todas las operaciones desde el sacrificio de la hembra y la obtención sus oviductos hasta la introducción los COCs en la gota de MEDIO CARD®, en el menor tiempo posible (unos 30 segundos).

Es más, cuando realice esta tarea solo, no sacrifique muchos ratones a la vez; por el contrario, sacrifique un ratón y obtenga rápidamente sus oviductos antes de comenzar con otro animal.

- Mantenga la placa de fertilización con los COCs en un incubador (37°C , 5% CO₂ balanceado en aire) durante 30-60 minutos antes de la inseminación.

Inseminación

- Use la punta de pipeta (Pipette tip Cat. No. 114; Quality Scientific Plastics) para agregar cantidades apropiadas (usualmente unos 3 µL) de la suspensión de espermatozoides a la gota de MEDIO CARD® que contiene los COCs.
- Coloque la placa de fertilización en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire).



3. 3 horas después de la inseminación, lave los ovocitos 3 veces en medio mHTF (80 μ L) en la placa de lavado, evitando transferir el MEDIO CARD®.

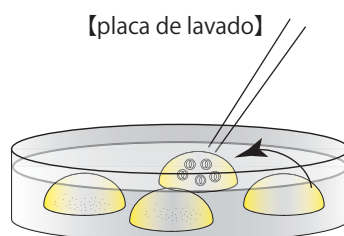


4. Seis horas después de la inseminación, observe los ovocitos en la tercer gota de mHTF y elimine todos los ovocitos partenogénicos que tengan solo un pronúcleo.

[Aspecto de los ovocitos fertilizados, no fertilizados y partenogénicos]



5. Después de incubar los ovocitos durante la noche, transfiera a la cuarta gota de mHTF de la placa de lavado solo los embriones en 2-celulas. Estos embriones pueden ser vitrificados, transferidos a una hembra receptora o cultivados hasta el estadio de blastocito. (Por favor, consulte los capítulos de Vitrificación simple de embriones de ratón en la página 54 y de Transferencia embrionaria en oviducto en la página 66.)



Referencias

1. Toyoda Y., Yokoyama M., and Hosi T. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16: 147-151.

Nota

En este estadio es importante que usted pueda identificar y eliminar los ovocitos partenogénicos.

Es importante ya que si no los elimina en este estadio, al día siguiente se encontrarán en el estadio de 2-celulas y será imposible distinguir los ovocitos fertilizados de los ovocitos partenogénicos.

Nota

Los ovocitos fertilizados tienen ambos pronúcleos (A) masculino y femenino.

Por otra parte, los ovocitos partenogénicos tienen solo un pronúcleo (B) y los ovocitos no fertilizados no tienen ningún pronúcleo (C).

1-3 Fertilización *in vitro* (FIV) usando el reactivo para ultra-superovulación

Materiales y equipo

1. Reactivo para ultra-superovulación (CARD HyperOva)

Los otros materiales son los mismos que los usados para la FIV usando PMSG.
(Por favor consulte el capítulo de fertilización *in vitro* en la página 6.)

Procedimientos

Ultra-superovulación

1. Inyectar un ratón hembra de 26 – 30 días (contando 0 el día de su nacimiento) 0.1-0.2 mL i.p del CARD HyperOva para inducir superovulación. (EL CARD HyperOva se administra durante el ciclo de luz, normalmente entre las 17:00 y 18:00 horas).
2. Continuar 48 horas más tarde con una inyección i.p de 7.5 IU de la gonadotrofina coriónica humana (hCG).

Preparación de las placas y recolección de esperma

1. Prepare las placas y recolecte el esperma de igual manera que para la FIV utilizando PMSG.
(Por favor consulte el capítulo de fertilización *in vitro* en la página 6.)

Recolección de ovocitos

Cuando se utilice CARD HyperOva los oviductos de las hembras superovuladas aumentan de tamaño considerablemente. Por favor asegúrese de manipular los oviductos con cuidado de no romperlos siguiendo el método descrito debajo.

1. Extraiga los oviductos (Ámpulas) de la cavidad abdominal de las hembras.
2. Colóquelos sobre un filtro de papel estéril y con suavidad elimine sangre y fluidos.
3. Sumerja los oviductos en el aceite mineral de la placa de fertilización.
4. Use una gota de MEDIO CARD® (200µL) por hembra (2 oviductos).

Para los procedimientos siguientes, por favor consulte el capítulo de fertilización *in vitro* en la página 9.

Inseminación

1. Para la inseminación use 6 µL de la suspensión pre-incubada de esperma de forma idéntica a la detallada para la FIV usando PMSG.

Para los otros procedimientos en relación con la inseminación, por favor consulte el capítulo de fertilización *in vitro* en la página 10.

Referencias

1. Takeo T., Nakagata N. 2015. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS ONE* **10**(5): e0128330. doi:10.1371/journal.pone.0128330
2. Takeo T., Nakagata N. 2016. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. *Theriogenol.* doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.076

2-1 Recolección y transporte en frío de la cola (cauda) del epidídimo

Materiales y equipo

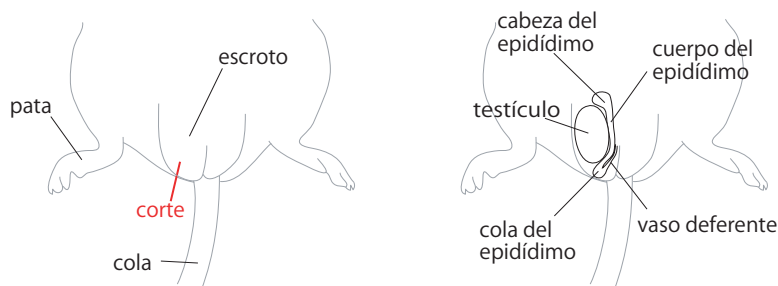
1. Ratón macho (más de 12 semanas de edad)
2. Anestésico
3. Placa térmica (37°C)
4. Tijeras de disección
5. Pinzas de relojero #5
6. Grapas quirúrgicas (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) y aplicador de grapas (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Registro de temperatura (Thermochron iButton Cat. No. DS1921G; Maxim Integrated Products)
8. Solución para almacenado en frío de epidídimos (Cat. No. KYD-007-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
9. Kit de transporte en frío CARD (Cat. No. KYD-006-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
 - Termo (Cat. No. JMK-501; Thermos K.K.)
 - Caja de cartón (en donde se pueda ubicar un tubo de 0.2 mL)
 - Algodón
 - Bolsas de gel refrigerante (pequeña y grande)
 - Caja de transporte de espuma de Poliestireno (KARUX KC-3)

Tanto el kit de transporte CARD a baja temperatura como la solución de mantenimiento deben ser enfriadas a 4-8°C antes de su uso.

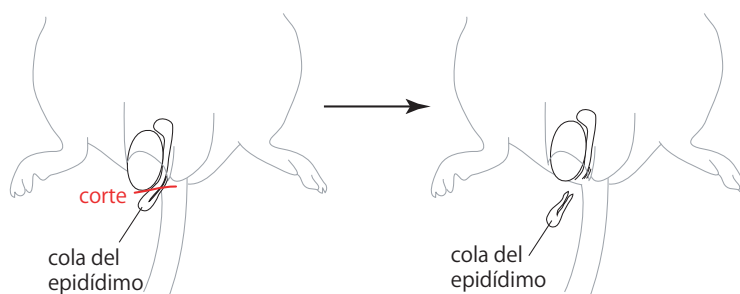
Procedimientos

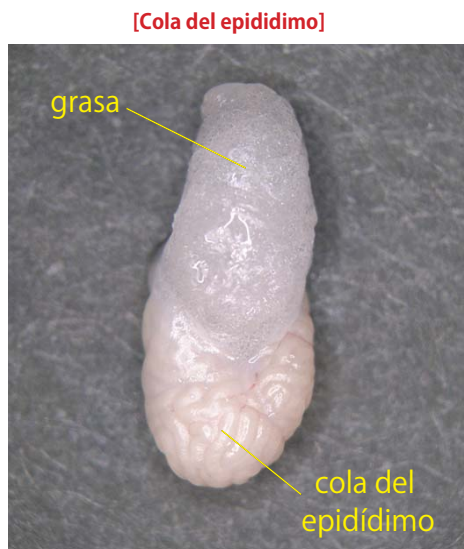
Obtención de la cola del epidídimo

1. Anestesia un ratón macho.
2. Haga una pequeña incisión en el escroto y exponga la cola del epidídimo.



3. Corte el vaso deferente y el cuerpo del epidídimo, y saque la cola del epidídimo.





[Obtención de una cola de epidídimo de un macho anestesiado] No. 03-01

4. Empuje el testículo dentro del abdomen y cierre la herida con una grapa quirúrgica.
5. Mantenga el ratón sobre una placa térmica a 37°C hasta que se recupere de los efectos de la anestesia.

Comentario

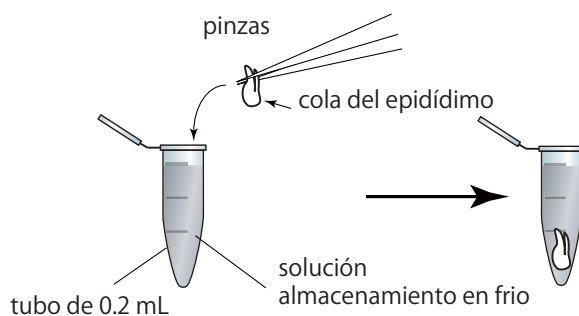
Una semana después de la operación el macho ya puede ser apareado.

Embalado y transporte de la cola del epidídimo

Todos los elementos a ser utilizados en el embalado de la cola del epidídimo deben mantenerse a 4-8°C hasta el momento de su uso.

Aún más, el procedimiento de embalado debe completarse lo más rápido posible para prevenir que la cola del epidídimo y los elementos del utilizados se calienten.

1. Ponga la cola del epidídimo en el tubo de 0.2 mL que contiene la solución para almacenamiento en frío.



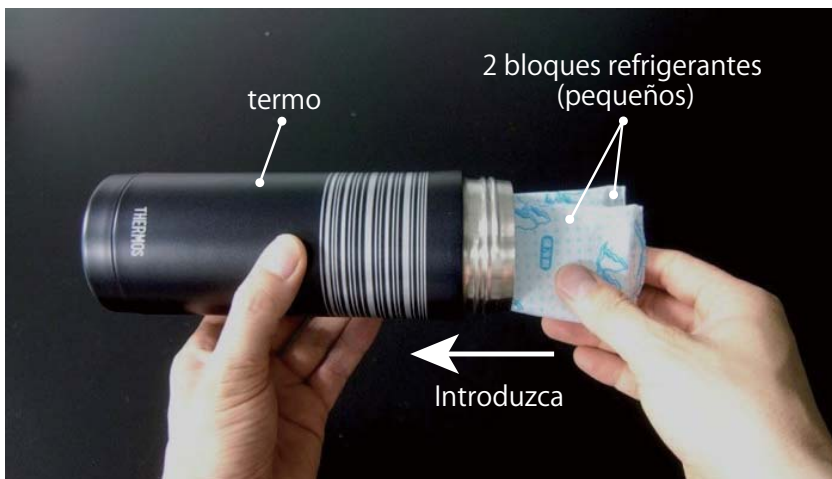
2. Coloque el tubo con la cola del epidídimo, un registrador de datos temperatura y un poco de algodón en la caja de cartón.



- Introduzca la caja de cartón con la cola del epidídimo en el termo.



- Introduzca 2 bloques refrigerantes (pequeños) dentro del termo.



- Cierre el tapa del termo.



- Coloque el bloque refrigerante (grande) en el fondo de la caja de transporte, y ponga el termo sobre él.
- Ponga un bloque refrigerante (grande) a cada lado del termo, y un bloque (grande) más sobre él. Cierre la caja con su tapa.

Nota

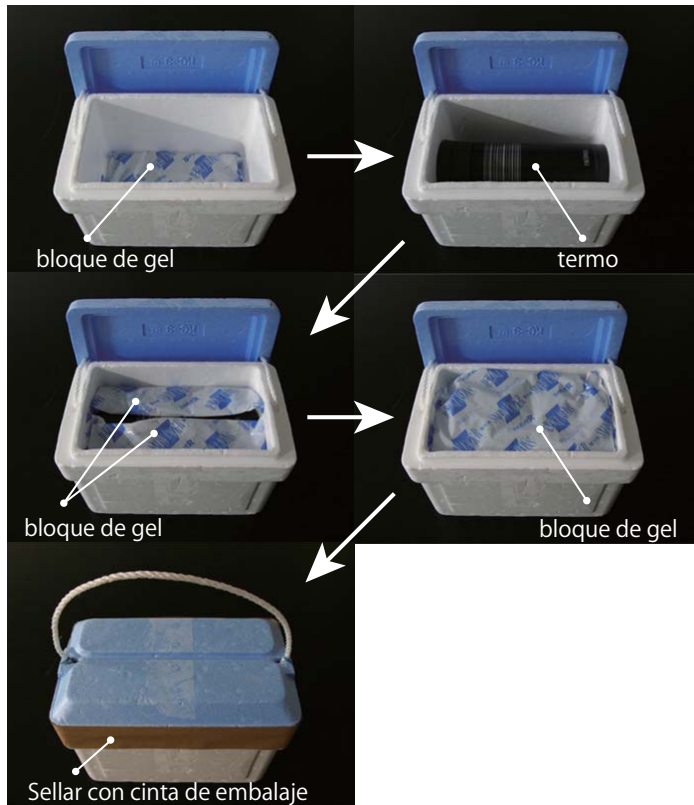
Tenga cuidado de colocar la caja de cartón con la tapa hacia arriba.

Nota

Solo es posible colocar el termo en el centro de la caja de transporte y no en el mismo fondo, por que el largo del termo es el mismo que el largo interno de la caja.

Esto es para proteger el termo durante el envío.

8. Cierre la tapa de la caja de transporte usando cinta adhesiva.



9. Mantenga la caja de transporte en el refrigerador hasta que el transportista llegue a buscarlo.
10. Envíe las muestras por correo regular.6.

References

1. Takeo T., Tsutsumi A., Omaru T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Nakamuta Y., Takeshita Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Sakoh K., Nakao S., Yoshimoto H., Shimizu N., and Nakagata N. 2012. Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology*. 65(3): 163-168.

Nota

Las muestras deben transferirse a baja temperatura. Por favor, consulte con el servicio de transporte sobre las condiciones durante el transporte.

Comentario

El esperma del epidídimo en frío mantiene la fertilidad durante 72 horas.

2-2 Fertilización *In Vitro* usando espermatozoides del epidídimo transportados en frío

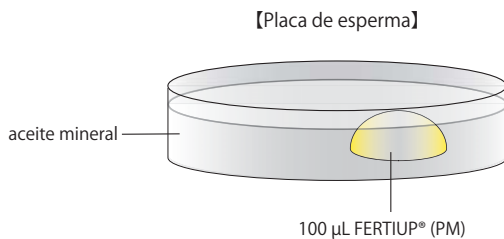
Materiales y equipo

1. Epidídimo transportado en frío
2. FERTIUP® (Medio de Pre-incubación: PM, Cat. No. KYD-002-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
3. mHTF
4. Aceite mineral
5. Micro pipetas
6. Placas de cultivo (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
7. Tijeras de disección
8. Pinzas de relojero #5
9. Papel de filtro
10. Incubador humidificado (37°C , 5% CO₂ en aire)

Procedimientos

Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo

1. Treinta minutos antes de obtener el espermatozoides del epidídimo transportado en frío ponga una gota (100 µL / gota) de FERTIUP®(PM) en una placa, cúbralo con aceite mineral, y coloque la placa en el incubador (37°C , 5% en aire).

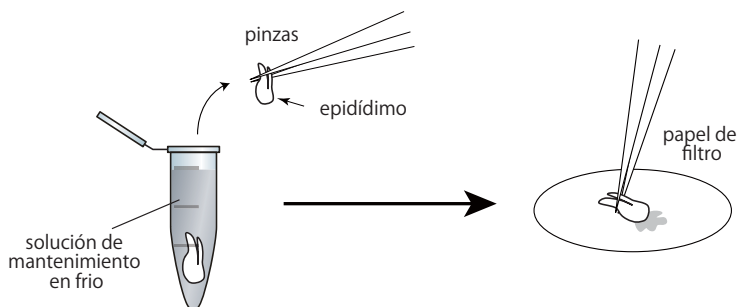


2. Saque el tubo de 0.2 mL con la muestra de la caja de transporte.

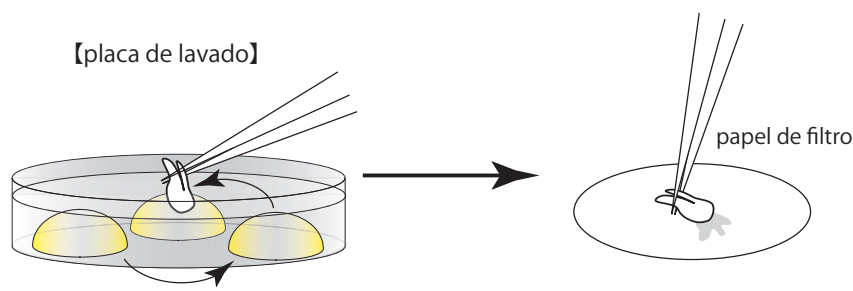
[Retirando la muestra] No. 04-01



3. Abra el tubo, saque el epidídimo y seque todo rastro de la solución de transporte usando un filtro de papel.



4. Lave el epidídimo en cada una de las tres gotas de mHTF de la placa de lavado.



5. Ponga el epidídimo en la placa de espermia cubierta de aceite mineral. El espermia del Epidídimo transportado en frío puede utilizarse para fertilización *in vitro* de la misma forma que el espermia fresco.
Por favor, consulte el capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 6.

Referencia

1. Takeo T., Tsutsumi A., Omaru T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Nakamuta Y., Takeshita Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Sakoh K., Nakao S., Yoshimoto H., Shimizu N., and Nakagata N. 2012. Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology*. 65(3): 163-168.

Comentario

Para preparar la placa de lavado, justo antes de su uso ponga 3 gotas (aprox. 100 μL / gota) de mHTF en una placa sin aceite mineral.

Nota

Si encuentra difícil obtener espermia de la cola del epidídimo, haga un nuevo corte para que salga más espermia.

Nota

Hay tres formas distintas de preparar el MEDIO CARD®, dependiendo en si la fertilización *in vitro* se hará con espermia fresco, congelado o enfriado.

Por favor consulte con el manual de instrucciones del MEDIO CARD®.

3-1 Criopreservación de Esperma de ratón

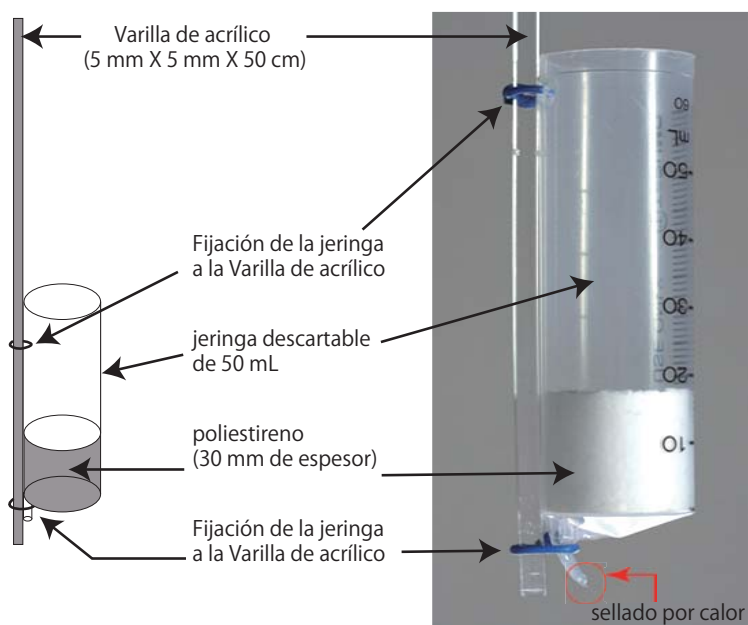
Materiales y equipo

1. Ratón macho (mas de 12 semanas)
2. Tijera de micro-disección con muelle (5 mm de hoja)
3. Pinza de relojero #5
4. FERTIUP® (Crioprotector: CPA, Cat. No. KYD-001-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. mHTF
6. Aceite mineral
7. Placas de plastico. (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Puntas de pipeta
9. Pajuelas de semen (10 piezas x 10 units, EOG sterilized, Cat. No. KYD-S020X10; Cosmo Bio Co., Ltd.)
10. Micropipetas
11. Conector de pajuela (Cat. No. KYD-S025, Cosmo Bio Co., Ltd.)
12. Sellador por impulso
13. Canastilla para la congelación (Cat. No. KYD-S018; Cosmo Bio Co., Ltd.)
14. Casete triangular (10 units, Cat. No. KYD-S021 or KYD-S035; Cosmo Bio Co., Ltd.)
15. Tanque de nitrógeno líquido o tanque de transporte en seco
16. Placa térmica (37 °C)

Procedimientos

Preparación de la canastilla de congelación

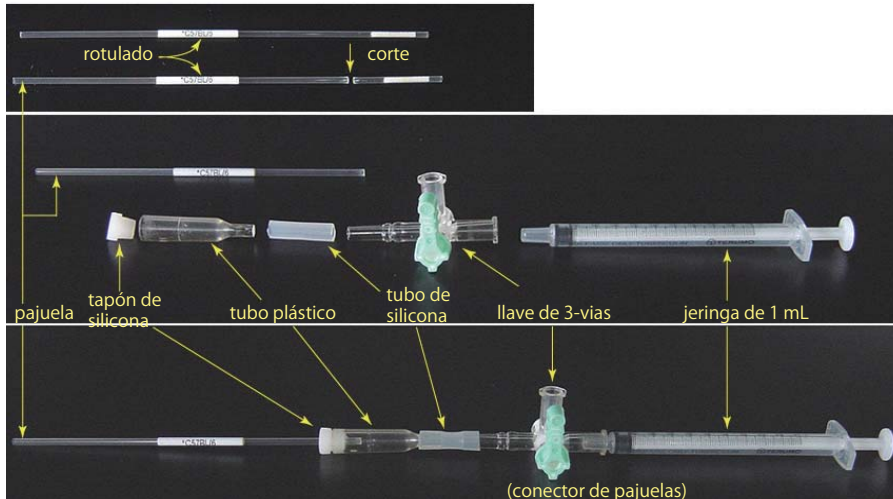
1. Inserte un trozo bien ajustado de poliestireno en el fondo de la jeringa.
2. Selle con calor el pico de la jeringa.
3. Fije la jeringa a la varilla de acrílico.



Preparación del conector de pajuelas

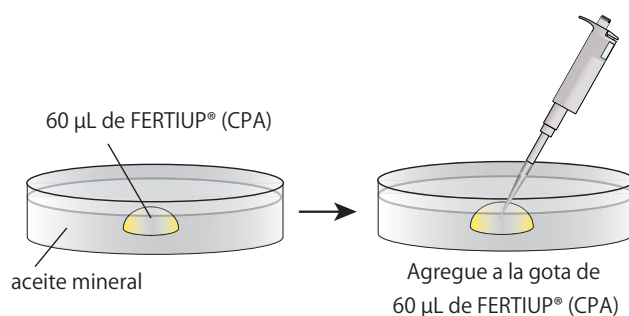
1. Haga un conector de pajuela como lo muestra el diagrama de abajo usando una jeringa de 1 mL, una llave de 3-vías, un trozo de tubo de silicona, un tubo plástico y un tapón de silicona.
2. Para usar el conector de pajuelas, corte el tapón de algodón de la pajuela, después conecte la pajuela a través del tapón de silicona ubicado al final de conector.

[Conexión de la pajuela al conector]

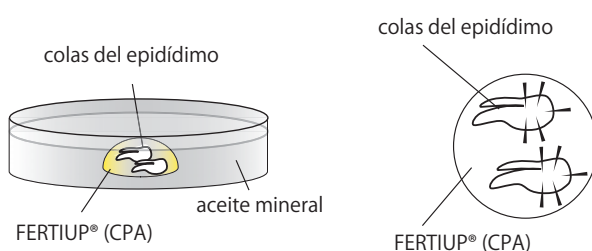


Preparación de la suspensión de espermatozoides

1. Prepare una placa plástica de 35 mm con una gota de 60 μL de FERTIUP® (CPA) y cúbralo con aceite mineral.
2. Agregue a la gota una alícuota de 60 μL de la misma solución (volumen final: 120 μL) para crear una gota alta y semiesférica. Mantenga la placa sobre una placa térmica a 37°C hasta su uso.



3. Sacrifique un ratón macho (>12 semana de edad) mediante dislocación cervical y obtenga los dos epidídimos asépticamente.
4. Coloque los epidídimos sobre un trozo de papel de filtro y bajo microscopio elimine completamente la sangre y la grasa del tejido.
5. Transfiera los epidídimos a la gota de FERTIUP® (CPA). Use unas pinzas de relojero #5 y unas tijeras de micro-disección con muelle para hacer 5 o 6 incisiones en el epidídimo.



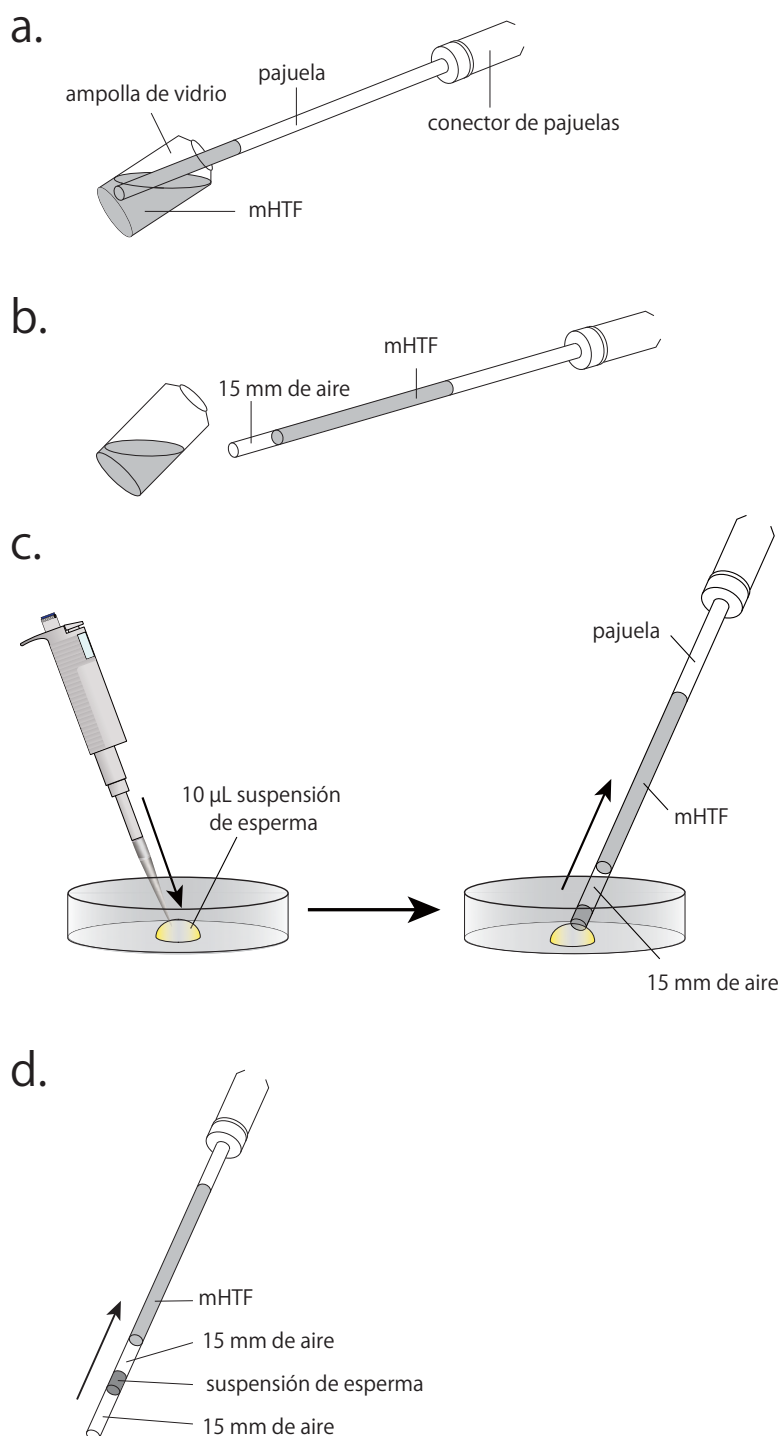
6. Coloque la placa sobre la platina térmica a 37 °C por 3 minutos. Durante este periodo de tiempo, a cada minuto rote la placa para dispersar el espermatozoides del órgano al medio FERTIUP® (CPA).

[Cortando el epidídimo y preparando la suspensión de espermatozoides] No.05-01

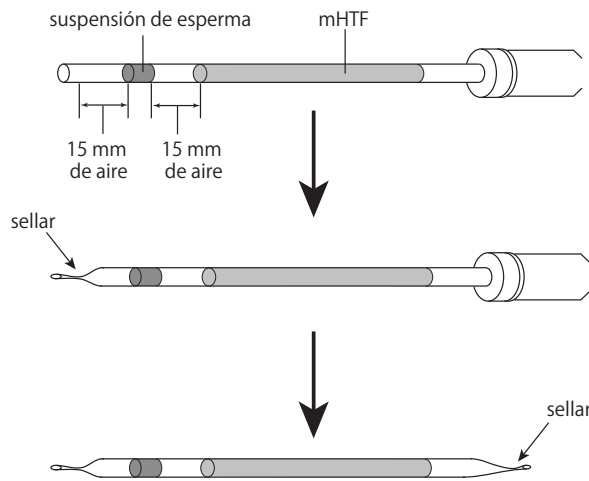


Preparación de la pajuela con la suspensión de espermatozoides

1. Ponga una pajuela en el conector de pajuelas.
2. Con cuidado aspire las soluciones en la pajuela en el siguiente orden:
 - a. 100 µL de mHTF,
 - b. 15 mm de aire,
 - c. 10 µL de la suspensión de espermatozoides,
 - d. otra columna de 15 mm de aire.



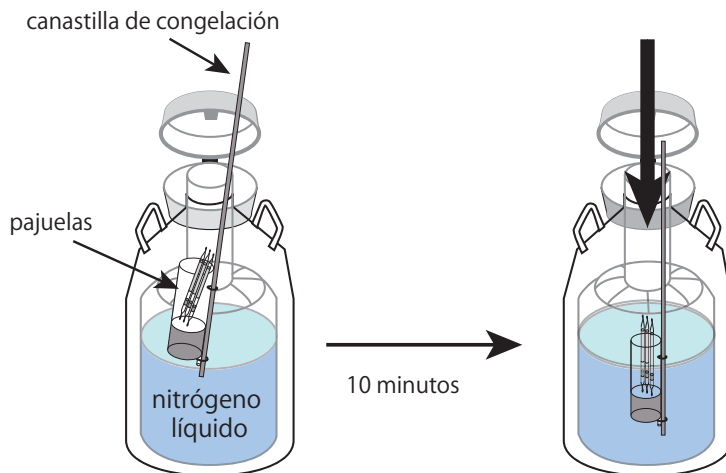
- Selle los dos extremos de la pajuela usando un sellador de impulso.



- Generar 10 muestras por ratón de la misma forma que la descrita arriba.

Congelación de espermatozoides utilizando un tanque de nitrógeno líquido

- Coloque las muestras en la canastilla de congelación y déjelas flotar sobre el nitrógeno líquido del tanque.
- Después de 10 minutos, sumerja la canastilla en forma rápida en el nitrógeno líquido.



[La canastilla de congelación flotante]

[Sumergiendo la canastilla de congelación]



10 minutos



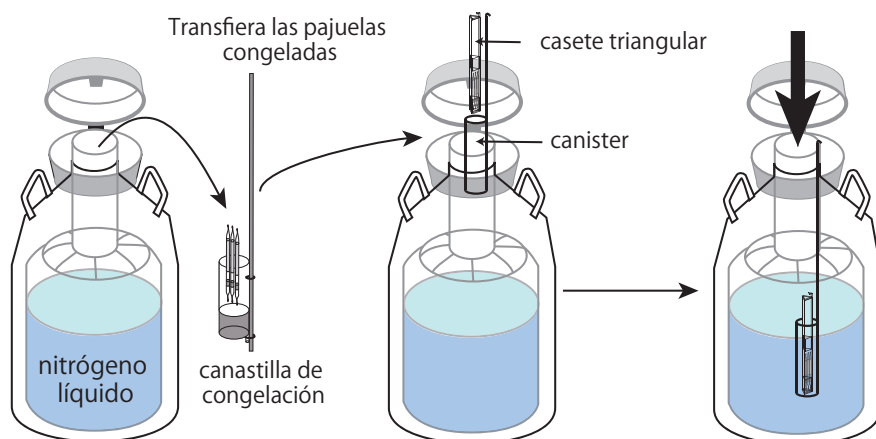
[Congelación de pajuelas] No. 05-02



Comentario

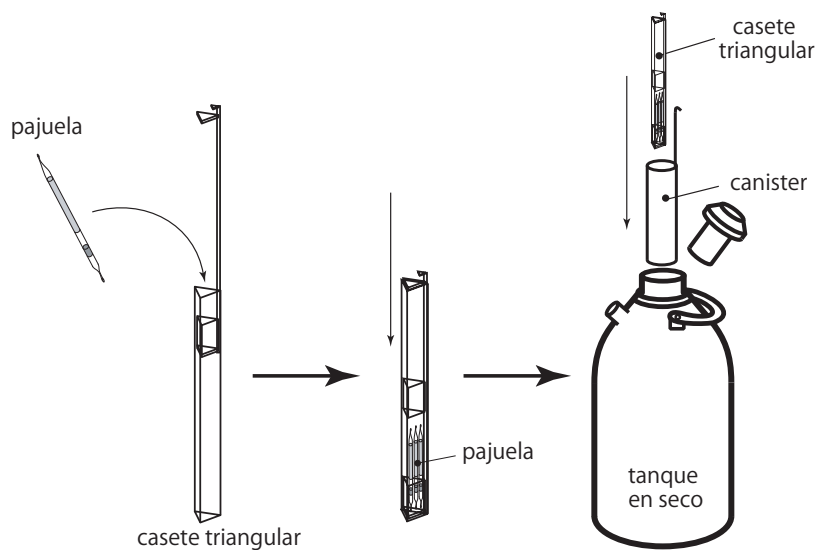
Cargando la pajuela con 100 μL de mHTF previene que esta flote en la superficie del nitrógeno líquido. Esto sucede por que el mHTF hace de contrapeso que fuerza a la pajuela a hundirse en el nitrógeno líquido.

3. Saque la canastilla de congelación llena de nitrógeno líquido, y transfiera las pajuelas a un casete triangular para almacenarlos en el tanque de nitrógeno líquido.



Congelación de espermatozoides utilizando un tanque de transporte en seco

1. Transfiera las pajuelas congeladas a un casete triangular.
2. Ponga el casete triangular en un canister previamente enfriado.
3. Vuelva a poner el canister en el tanque seco y déjelo por 10 minutos.



Comentario

La congelación de espermatozoides usando un tanque de transporte en seco puede ser utilizada para el envío de espermatozoides criopreservados.

Referencias

1. Nakagata N., and Takeshima T. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenol.* **37**: 1283-1291.
2. Nakagata N., Ueda S., Yamanouchi K., Okamoto K., Matsuda Y., Tsuchiya T., Nishimura M., Oda S., Koyasu K., Azuma S., and Toyoda Y. 1995. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. *Theriogenol.* **43**: 635-643.
3. Nakagata N. 1996. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 236-238.
4. Okamoto M., Nakagata N., Ueda O., Kamada N., and Suzuki H. 1998. Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. *J. Mamm. Ova. Res.* **15**: 77-80.
5. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura KI., Irie T., and Nakagata N. 2008. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod.* **78**(3): 546-551.
6. Nakagawa Y., Fukumoto K., Kondo T., Koga M., Takeshita Y., Nakamuta Y., Sakaguchi M., Haruguchi Y., Tsuchiyama S., Kaneko T., and Nakagata N. 2009. Fertilization ability of C57BL/6J mouse spermatozoa frozen in a dry shipper. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 297.
7. Takeo T., and Nakagata N. 2010. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab. Anim.* **44**(2): 132-137.
8. Nakagata N. 2011. Cryopreservation of mouse spermatozoa and *in vitro* fertilization. *Methods Mol Biol.* **693**: 57-73.
9. Takeo T., Nakagata N. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL /6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol Reprod.* **85**(5): 1066-1072.

3-2 Fertilización *In Vitro* usando espermatozoides criopreservados

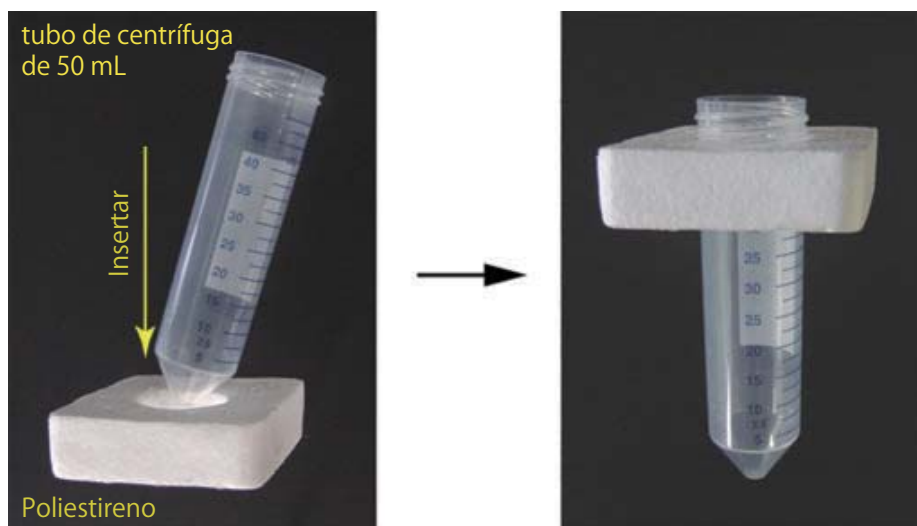
Materiales y equipo

1. Ratones hembras superovuladas con PMSG y hCG
2. FERTIUP® (medio de preincubación: PM, Cat. No. KYD-002-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
3. MEDIO CARD® (Cat. No. KYD-003-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
4. mHTF
5. Aceite mineral
6. Puntas de pipetas (Cat. No. 3520; Thermo SCIENTIFIC)
7. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Conector de pajuela (Cat. No. KYD-S025; Cosmo Bio Co., Ltd.) (Por favor, consulte al capítulo de criopreservación de espermatozoides de ratón en la página 21.)
9. Baño de agua a 37°C
10. Flotador para el descongelado
11. Micropipetas
12. Incubador humidificado (37°C , 5% CO₂ en aire)

Procedimientos

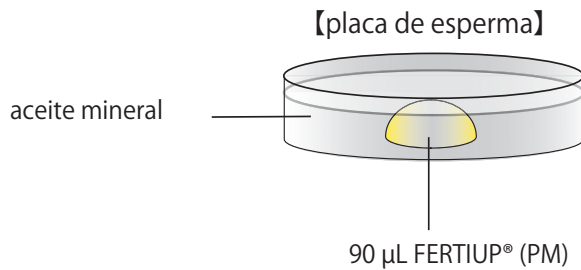
Preparación del flotador para el descongelado

1. Haga un flotador como el que se muestra a continuación usando poliestireno y un tubo de centrifugación de 50 mL.

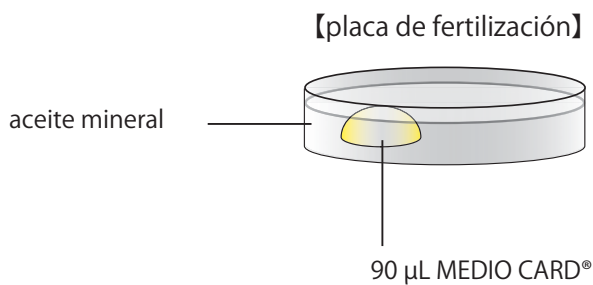


Preparación para el descongelado

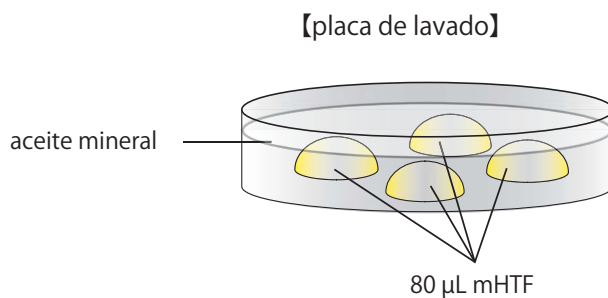
1. Prepare el baño de agua a 37°C .
2. Llene de agua (37°C) el tubo de centrifuga de 50 mL insertado en el poliestireno, y déjelo flotar en el baño de agua.
3. Treinta minutos antes de descongelar la pajuela prepare una placa con 1 gota (90 µL / gota) de FERTIUP®(PM) y cúbrala con aceite mineral; coloque la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire).



4. Diez minutos antes de recolectar los ovocitos prepare una placa con 1 gota (90 µL / gota) de MEDIO CARD® y cúbrala con aceite mineral; coloque la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire).



5. Ponga 4 gotas (80 µL / gota) de mHTF en una placa y cúbrala con aceite mineral. Coloque la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) durante al menos 30 minutos.



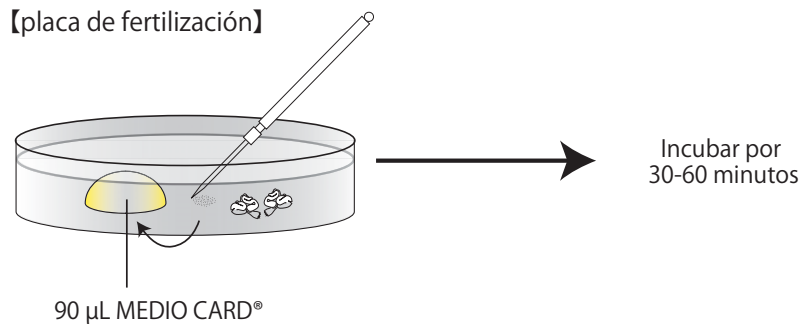
Nota

Hay tres formas distintas de preparar el MEDIO CARD®, dependiendo de si la fertilización *in vitro* se hará con espermatozoides frescos, congelados o refrigerados.

Por favor consulte el manual de instrucciones del MEDIO CARD®.

Obtención de ovocitos

1. Sacrifique las hembras 15-17 horas después de la inyección de hCG y extraiga los oviductos. (Por favor consulte al capítulo de fertilización *In Vitro* en la página 9.)
2. Usando agujas de disección, coloque hasta 4-6 masas de complejos cumulas-ovocito (COCs) en cada gota de MEDIO CARD® (90 µL) (placa de fertilización).
3. Mantenga la placa de fertilización con los COCs en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por 30-60 minutos antes de la inseminación.



Nota

Asegúrese de realizar todo el trabajo, desde el sacrificio de la hembra y obtener sus oviductos a introducir los COCs en la gota de MEDIO CARD®, en el menor tiempo posible (dentro de los 30 segundos).

Es más, cuando en este proyecto trabaje solo, no sacrifique muchos ratones a la vez, es preferible, sacrificar un ratón y rápidamente obtener sus oviductos antes de continuar con el próximo.

Descongelación del espermatozoides de ratón

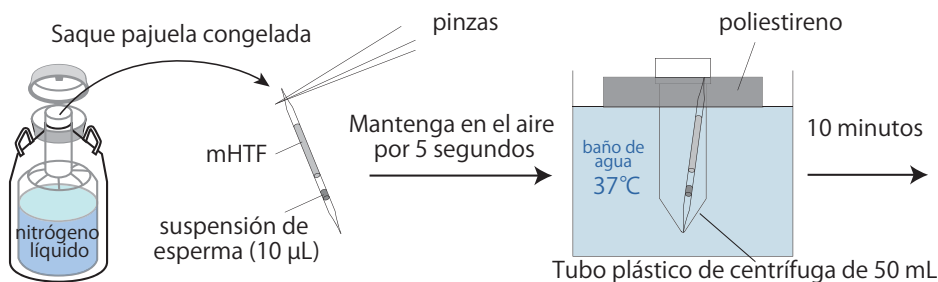
1. Saque del nitrógeno líquido una pajuela congelada y manténgala en el aire por 5 segundos.
2. Una vez pasado ese corto tiempo, inmediatamente sumerja la pajuela en el tubo flotando en el baño de agua a 37°C por 10 minutos.
3. Luego de 10 minutos, retire la pajuela del tubo.
4. Seque el agua de la pajuela con una toalla de papel.

Nota

Para asegurarse la descongelación de la pajuela, sumerja completamente en el baño de agua la parte de la pajuela que contiene el espermatozoides.

Es más, el espermatozoides descongelado es sensible a los cambios ambientales.

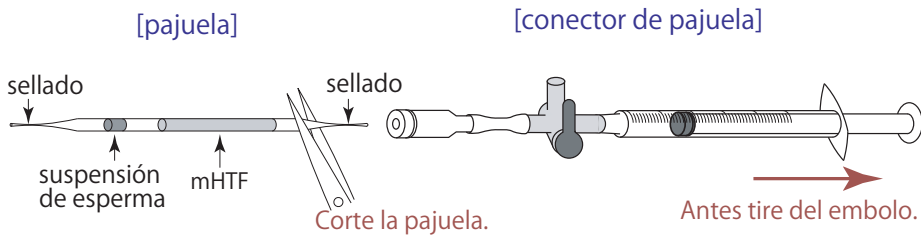
Si la pajuela no es mantenida en el baño de agua el tiempo suficiente (10 minutos), la motilidad del espermatozoides criopreservado se verá reducido.



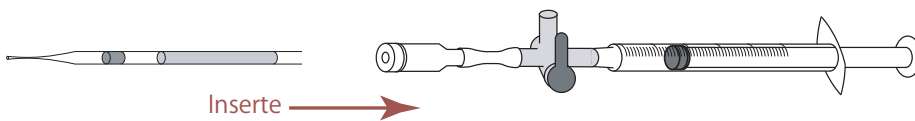
[Descongelado del espermatozoides de ratón] No. 06-01

Transferencia y pre-incubación de la muestra de espermatozoides descongelado

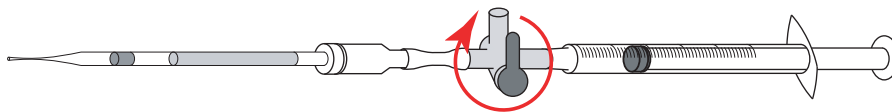
1. Tire el embolo de la jeringa del conector hacia atrás, y corte la pajuela entre las columnas del mHTF y el extremo sellado.



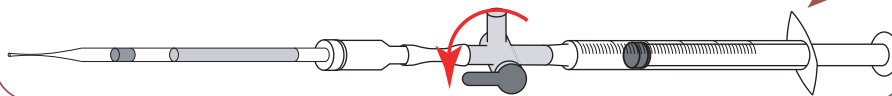
2. Inserte la pajuela cortada en el conector.



3. Como la inserción de la pajuela en el conector crea presión dentro de la pajuela, gire la llave para liberar la presión.



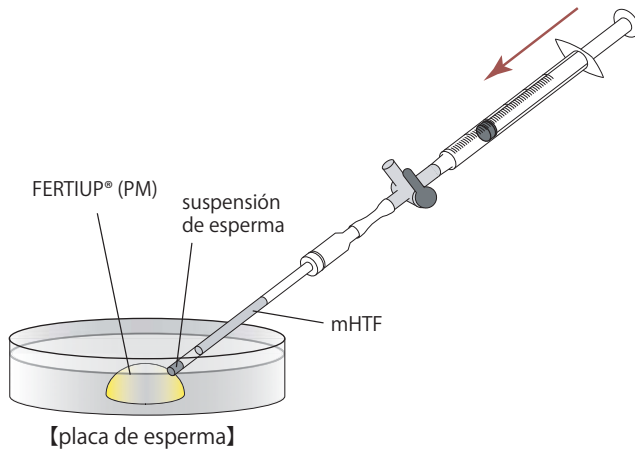
Si se ha olvidado de tirar del embolo de la jeringa, puede hacerlo ahora girando la llave hacia la izquierda.



4. Vuelva la llave a su posición original (hacia arriba), y corte la pajuela en el extremo sellado y la suspensión de espermatozoides.



- Empuje el embolo para transferir solo la suspensión de espermatozoides a la gota de FERTIUP® (PM) (placa de espermatozoides), coloque la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por 30 minutos

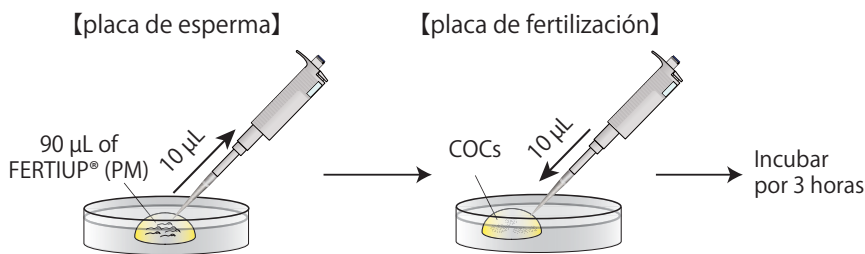


[Transferencia de la suspensión de espermatozoides descongelado] No. 06-02

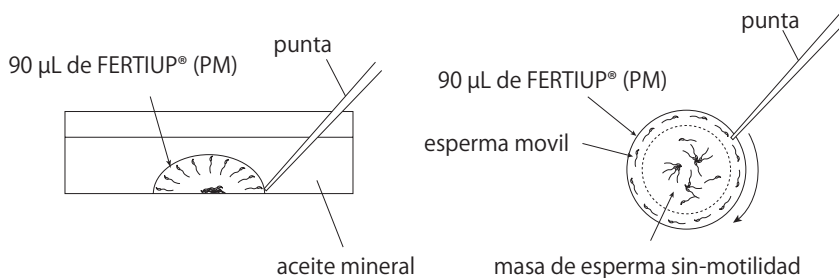


Inseminación

- Usando una punta de pipeta de boca ancha (Cat. No. 3520; Thermo SCIENTIFIC), aspire del borde de la gota 10 µL de la suspensión de espermatozoides pre-incubada.
- Ponga 10 µL del espermatozoides a cada gota de fertilización del MEDIO CARD® que tienen los COCs.
- Incube los ovocitos y el espermatozoides durante 3 horas en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire).



[Aspirar la suspensión de espermatozoides del borde de la gota]



[Recolección del espermatozoides pre-incubado e inseminación de los ovocitos]

No. 06-03



- Después de 3 horas de incubación, lave los ovocitos 3 veces en mHTF (80 µL) en una placa de lavado, evitando transferir el MEDIO CARD®

Nota

No mueva las placas que contienen el espermatozoides criopreservado hasta que se observe suficiente motilidad en el medio.

Si las placas son agitadas antes de que el espermatozoides comience a moverse, no se recobrará la toda la motilidad.

Comentario

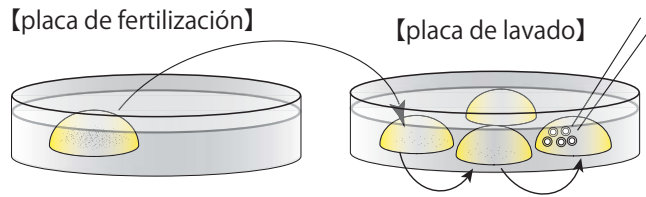
Los espermatozoides con alta motilidad tienden a estar cerca del borde de la gota.

Comentario

Es posible obtener 10 µL de la suspensión de espermatozoides hasta 3-4 veces por gota.

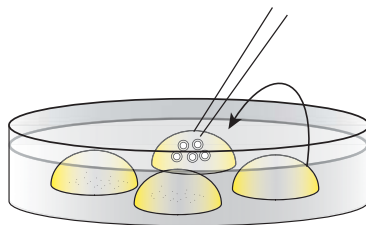
Nota

Haga el trabajo con la pipeta descrito en los pasos 1 y 2 lo más cuidadosamente posible.



5. Seis horas después de la inseminación, observe los ovocitos en la tercer gota de mHTF y elimine todo embrión partenogénico que tenga solo un pronúcleo. (Por favor, consulte al capítulo de fertilización *in vitro* en la página 11)
6. Después de incubar los ovocitos toda la noche, transfiera a la cuarta gota de mHTF solo los embriones en estadio de 2-celulas. Estos embriones pueden ser ahora vitrificados o transferidos. (Por favor, consulte a los capítulos de vitrificación simple de embriones de ratón en la página 54 y Transferencia embrionaria en oviducto en página 66.)

【placa de lavado】



Referencias

1. Nakagata N., and Takeshima T. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenol.* **37**: 1283-1291.
2. Nakagata N., Ueda S., Yamanouchi K., Okamoto K., Matsuda Y., Tsuchiya T., Nishimura M., Oda S., Koyasu K., Azuma S., and Toyoda Y. 1995. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. *Theriogenol.* **43**: 635-643.
3. Nakagata N. 1996. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 236-238.
4. Okamoto M., Nakagata N., Ueda O., Kamada N., and Suzuki H. 1998. Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. *J. Mamm. Ova. Res.* **15**: 77-80.
5. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura KI., Irie T., and Nakagata N. 2008. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol. Reprod.* **78**(3): 546-551.
6. Nakagawa Y., Fukumoto K., Kondo T., Koga M., Takeshita Y., Nakamura Y., Sakaguchi M., Haruguchi Y., Tsuchiyama S., Kaneko T., and Nakagata N. 2009. Fertilization ability of C57BL/6J mouse spermatozoa frozen in a dry shipper. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 297.
7. Takeo T., and Nakagata N. 2010. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl-β-cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab. Anim.* **44**(2): 132-137.
8. Nakagata N. 2011. Cryopreservation of mouse spermatozoa and *in vitro* fertilization. *Methods Mol Biol.* **693**: 57-73.
9. Takeo T., Nakagata N. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol. Reprod.* **85**(5):1066-1072.

3-3 Método de fertilización *In Vitro* para el rescate de un stock legado de espermatozoides criopreservados.

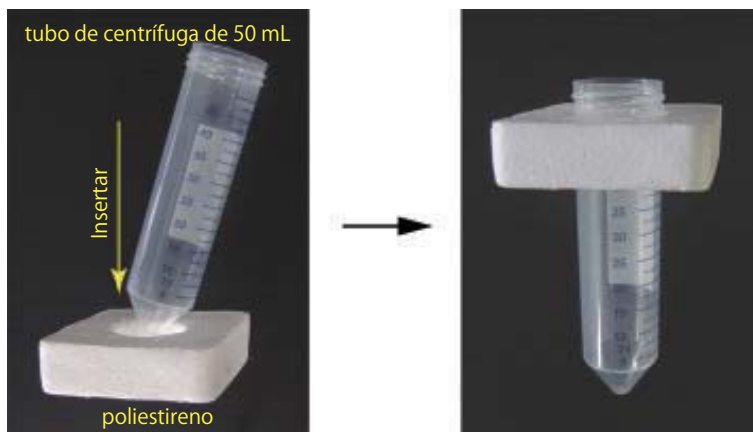
Materiales y equipo

1. Stock legado de espermatozoides criopreservados
2. Ratones hembras superovuladas con PMSG y hCG
3. FERTIUP® (Preincubation medium: PM, Cat. No. KYD-002-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
4. MEDIO CARD® (Cat. No. KYD-003-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. mHTF
6. Aceite mineral
7. Baño de agua a 37°C
8. Flotador para el descongelado
9. Tubo de 1.5 mL (Quality Scientific Plastics 1.5 mL Graduated Microcentrifuge Tube with Flat Top Cap, Natural Cat. No. 509-GRD-Q)
10. Centrífuga
11. Micropipetas
12. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
13. Incubador humidificado (37°C, 5% CO₂ en aire)

Procedimientos

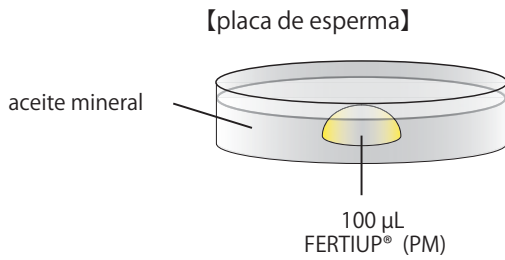
Preparación del flotador para el descongelado

1. Haga un flotador como el que se muestra a continuación usando poliestireno y un tubo de centrifuga de 50 mL.

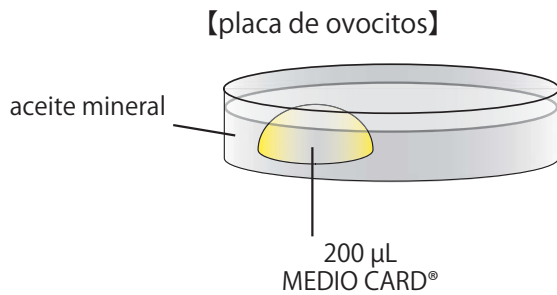


Preparación para el descongelado

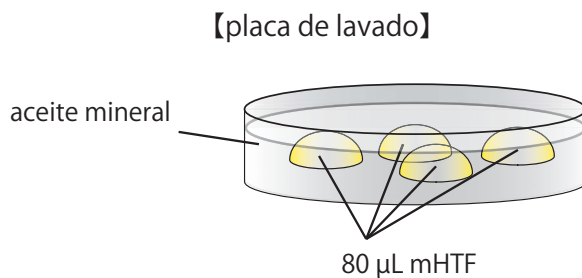
1. Prepare el baño de agua a 37°C.
2. Ponga agua (37°C) dentro del tubo de centrifuga de 50 mL del conjunto poliestireno/tubo de centrifuga que flota en el baño de agua.
3. Treinta minutos antes de descongelar la muestra de espermatozoides, ponga una gota (100 µL/gota) de FERTIUP® (PM) en una placa de plástico y cúbrala con aceite mineral. Coloque la placa en el incubador (37°C, 5% CO₂ en aire).



4. Diez minutos antes de recolectar los ovocitos ponga una gota (200 µL/gota) de MEDIO CARD® en una placa y cúbrala con aceite mineral. Coloque la placa en el incubador (37°C, 5% CO₂ en aire).

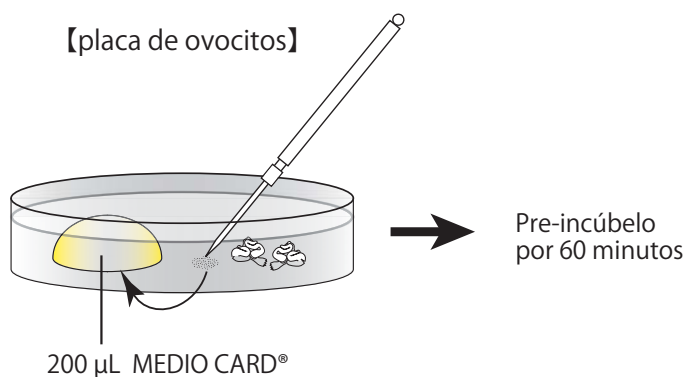


5. Ponga 4 gotas (80 µL / gota) de mHTF en una placa y cúbrala con aceite mineral. Coloque la placa en el incubador (37°C, 5% CO₂ en aire) al menos por 30 minutos.



Recolección y pre-incubación de ovocitos

1. Sacrifique los ratones hembras 15 a 17 horas después de la inyección de hCG y obtenga los oviductos. (Por favor consulte al capítulo de *in vitro* fertilización en la página 9)
2. Usando agujas finas y filosas, libere entre 6 y 20 masas de complejos ovocitos-cúmulos (COC's) en una gota de MEDIO CARD® (200 µL) (placa de ovocitos) y pre-incúbelo por 60 minutos.



Nota

Hay tres formas distintas de preparar el MEDIO CARD®, dependiendo de si la fertilización *in vitro* se hará con espermatozoides frescos, congelados o enfríos.

Por favor consulte el manual de instrucciones del MEDIO CARD®

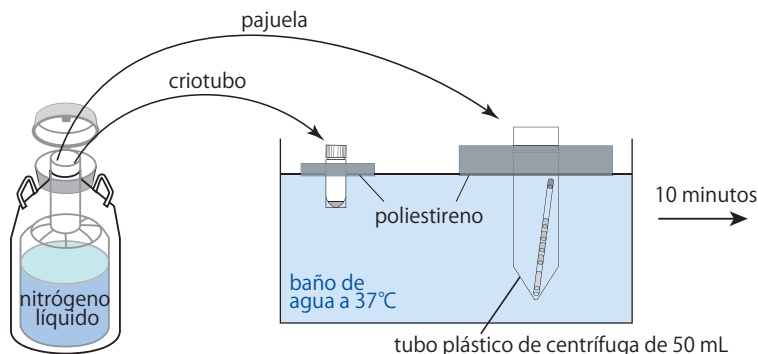
Nota

Asegúrese de realizar todo el trabajo, desde el sacrificio de la hembra para obtener sus oviductos hasta introducir los COCs en la gota de MEDIO CARD®, en el menor tiempo posible (dentro de los 30 segundos).

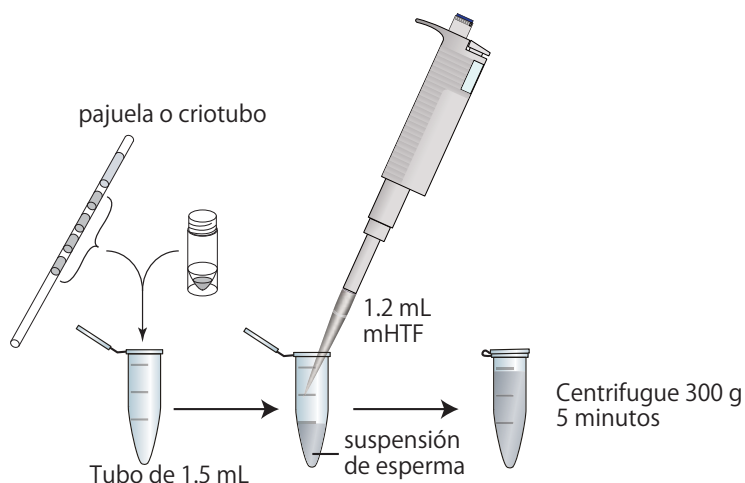
Es más, cuando este trabajo lo haga solo, no sacrifique muchos ratones a la vez, es preferible, sacrificar un ratón y rápidamente obtener sus oviductos antes de continuar con el próximo.

Descongelación del espermatozoides de ratón

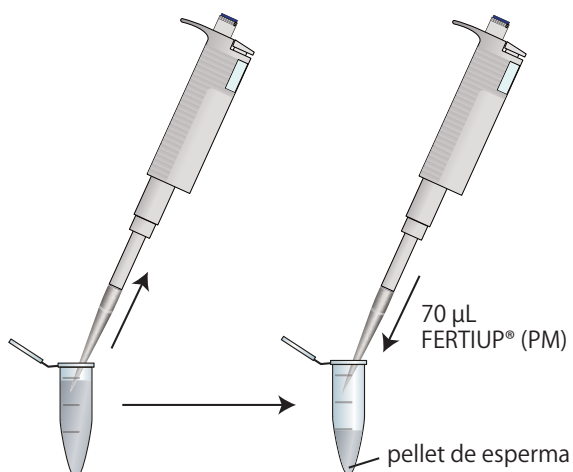
1. Extraiga una muestra de espermatozoides del nitrógeno líquido. Si la muestra fue archivada en un criotubo, abra el tapón y descarte el nitrógeno líquido que exista dentro del tubo. Sumerja la muestra en un baño de agua mantenida a 37°C (utilizando el poliestireno o el ensamblado de poliestireno/tubo de centrifugación) por 10 minutos.



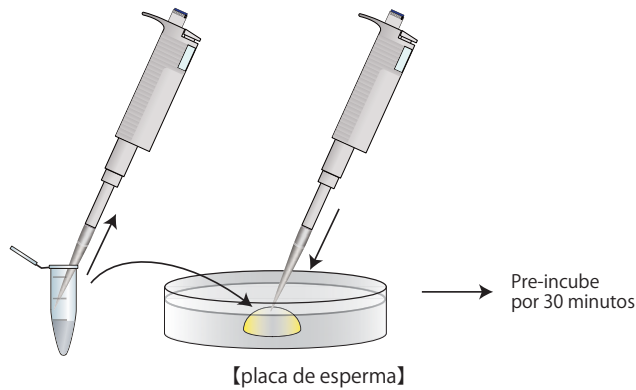
2. Transfiera la suspensión de espermatozoides del criotubo o pajuela a un tubo de 1.5 mL. Lentamente adicione al tubo 1.2 mL de mHTF equilibrado a 37°C, centrifugue a 300 g a temperatura ambiente durante 5 minutos.



3. Luego de centrifugado, elimine la mayor cantidad posible del sobrenadante y agregue al tubo 70 µL de FERTIUP® (PM) mantenido a 37°C (el volumen final será aprox. 100 µL).

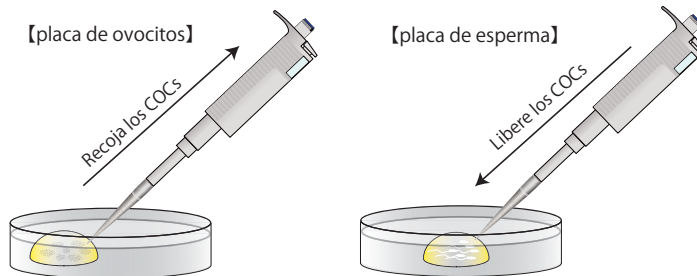


4. Luego de pipetear en forma suave, transfiera todo el contenido del tubo a la gota de FERTIUP® (PM) (placa de espermatozoides). Coloque la placa en el incubador (37°C, 5% CO₂ en aire) por 30 minutos.

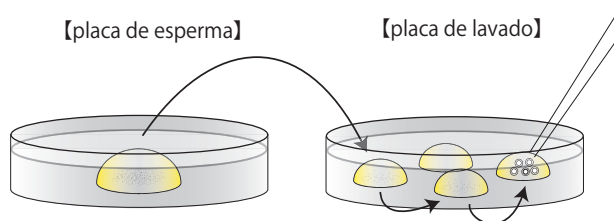


Inseminación

- Usando una punta de pipeta, aspire los COCs pre-incubados en la gota de MEDIO CARD® (placa de ovocitos) con una cantidad mínima de medio. Luego, colóquelos dentro de la gota de suspensión de espermia (placa de espermia) e incúbelos en un incubador. (37°C, 5% CO₂ en aire).



- Después de incubar por 3 horas, lave los ovocitos 3 veces en mHTF fresco (80 µL) en la placa de lavado.



- Seis horas después de la inseminación, observe los ovocitos en la tercer gota de mHTF y deseche todo ovocito partenogénico que tenga solo un pronúcleo. (Favor de remitirse al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 11.)
- Después de cultivar los ovocitos durante la noche, transfiera los embriones en estadio de 2-celulas que se hayan obtenido a la cuarta gota de mHTF. Estos embriones pueden ahora ser vitrificados o transferidos. (Por favor, consulte el capítulo de vitrificación simple de embriones de ratón en la página 54 y de Transferencia embrionaria en oviducto en la página 66.)



Referencias

- Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Takeshita Y., Nakamura Y., Umeno T., and Tsuchiyama S. 2014. Rescue *in vitro* fertilization method for legacy stock of frozen mouse sperm. *J Reprod Dev.* **60**(2): 167-170.

4-1 Preparación de ovocitos micro-diseccionados con laser

Algunas cepas de esperma congelado, como muchas de las líneas endogámicas, pueden tener una baja fertilidad. Con el fin de superar ese impedimento, hemos usado para la fertilización *in vitro* ovocitos que han sido micro diseccionados con laser.

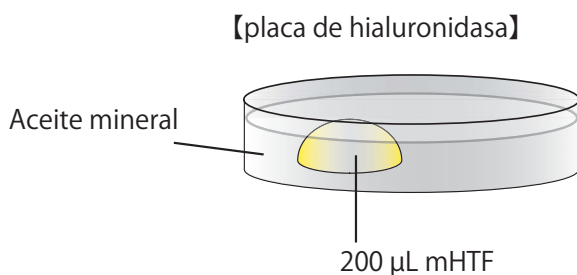
Materiales y equipo

1. Placas plásticas (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
2. mHTF
3. Aceite mineral
4. Hialuronidasa en mHTF (Hyaluronidase, Cat. No. H-3506; Sigma)
5. Sistema de laser saturn 3 (Research Instruments Ltd, Cornwall, UK)
6. Incubador humidificado (37°C, 5% CO₂ en aire)

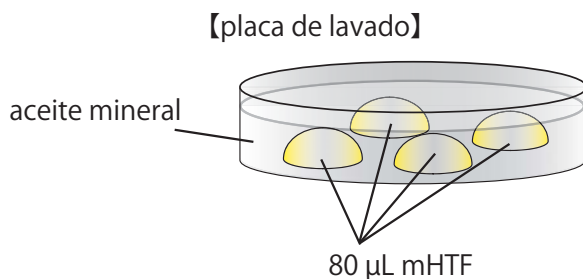
Procedimientos

Preparación del esperma y las placas

1. Para la FIV, el esperma debe ser preparado con los métodos descritos en los capítulos de Fertilización *in vitro* en la página 8, Fertilización *in vitro* usando esperma epididimario transportado a baja temperatura en la página 18 y Fertilización *in vitro* usando esperma criopreservado en la página 28.
2. Ponga una gota de 200 μ L de mHTF en una placa. Cúbrala con aceite mineral y colóquela en un incubador (37°C, 5% CO₂ en aire) al menos durante 30 minutos.

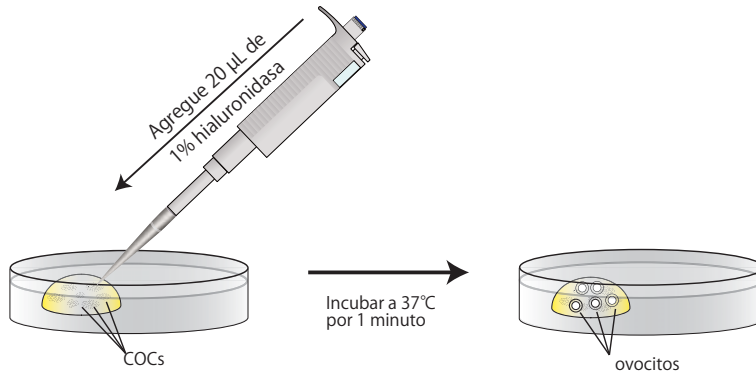


3. Coloque 4 gotas (80 μ L/gota) de mHTF en una placa. Cúbrala con aceite mineral y colóquela en el incubador (37°C, 5% CO₂ en aire) al menos durante 30 minutos.

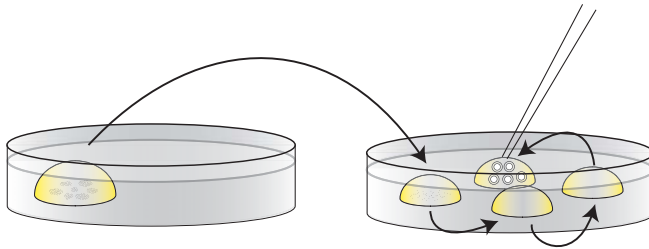


Preparación de los ovocitos desnudos

1. Obtenga de los ratones hembras superovuladas los complejos ovocitos-cúmulos (COCs) y póngalos en la gota de 200 μL de mHTF (placa de hialuronidasa). (Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 6 y 9.)
2. Agregue 20 μL de 1% hialuronidasa a la gota de mHTF que contienen los COCs y mantenga la placa en incubador (37°C , 5% CO_2 en aire) por 1 minuto.

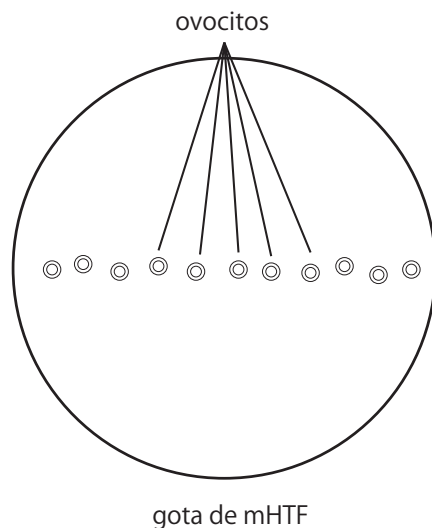


3. Rápidamente recolecte y transfiera los ovocitos a la gota de 80 μL de mHTF (placa de lavado) y en turnos, lávelos pasándolos por las distintas gotas de la placa de lavado.



Disección de la zona pelúcida usando un laser

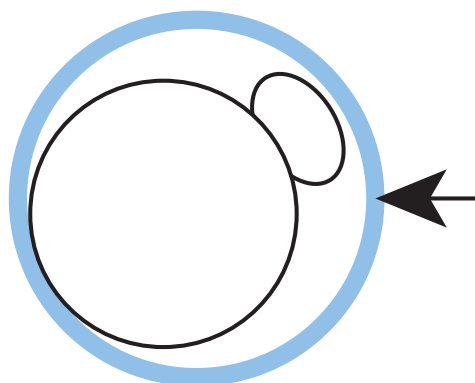
1. Coloque una gota de 100 μL de mHTF en una placa. Cúbrala con aceite mineral y colóquela en el incubador (37°C , 5% CO_2 en aire) al menos por 30 minutos.
2. Transfiera 50 ovocitos desnudos a la gota de 100 μL mHTF.
3. Coloque los ovocitos en línea en el fondo de la placa.



Comentario

Si algunas células del cúmulo siguen adheridas a la zona pelúcida de los ovocitos, pueden ser eliminados con la manipulación con el capilar de vidrio.

- Coloque la placa con los ovocitos bajo el sistema de laser Saturno 3.
- Enfoque la zona pelúcida al punto adyacente al primer corpúsculo polar y diséquelos con el rayo laser (vea la flecha)



[Disección por laser de la zona pelúcida] No. 08-01



- Después de diseccionar la zona pelúcida de todos los ovocitos, transféralos a la gota de MEDIO CARD® de fertilización. Coloque la placa en el incubador de CO₂. Por favor, consulte a los capítulos de Fertilización *in vitro* en la página 6, Fertilización *in vitro* usando espermatozoos del epidídimo transportados en frío en página 18 y Fertilización *in vitro* usando espermatozoos criopreservados en página 26.)

Referencias

- Kaneko T., Yanagi M., Nakashima T., and Nakagata N. 2006. The improvement in fertility of cryopreserved mouse spermatozoa showing low fertility using laser-microdissected oocytes. *Reprod. Med. Biol.* 5(4): 249-254.
- Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M., Nakashima T., Kaneko T., Taguchi Y., Tokoro M., Shin SW., Mitani T., Kato H., Matsumoto K., Nakagata N., and Iritani A. 2006. Application of laser-assisted zona drilling to *in vitro* fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse. *J Reprod Dev.* 52(5): 601-606.

Nota

Para evitar dañar la membrana plasmática de los ovocitos, apunte el laser al área donde la zona pelúcida este más distanciada de la membrana plasmática.

Nota

El diámetro del orificio es de 10-12.5 μm y la duración del pulso de 0.55-0.60 ms.

4-2 Disección parcial de la zona pelúcida (DPZ)

Si usted no puede utilizar un instrumento de laser para micro-disección, también puede diseccionar la zona pelúcida de los ovocitos bajo un microscopio estereoscópico.

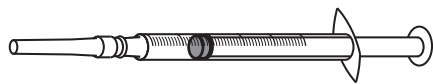
Materiales y equipo

1. Ratón hembra superovulada con PMSG y hCG
(Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 6.)
2. mHTF
3. mHTF con Hialuronidasa (Hyaluronidase, Cat. No. H-3506; Sigma)
4. Sacarosa 0.3M (BSA-)
5. Sacarosa 0.3M (BSA+)
6. Aceite mineral
7. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Puntas de pipetas (volumen 10-100 μ L)
9. Micropipetas

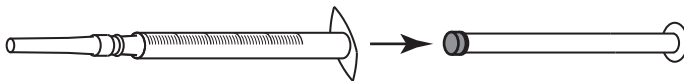
Procedimientos

Preparación de la aguja para DPZ

1. Una jeringa descartable de 1mL con una aguja 30 G deberá ser modificada para el uso en DPZ tal como muestra en el diagrama de abajo.

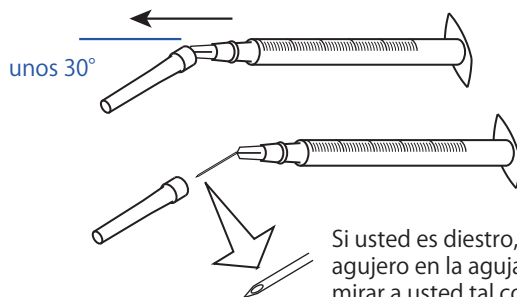


Coja una jeringa de 1 mL con una aguja 30 G.

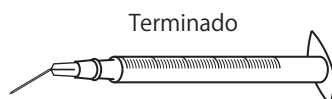


Quite y elimine el embolo.

Quite el capuchón de la aguja y úselo para doblar la aguja unos 30°.



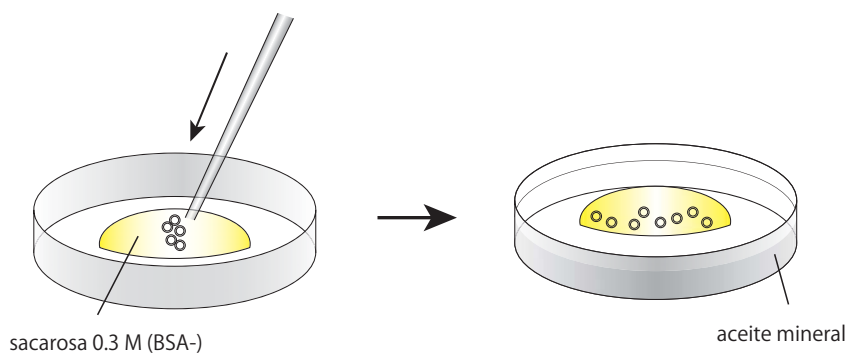
Si usted es diestro, el agujero en la aguja debe mirar a usted tal como los muestra el diagrama.



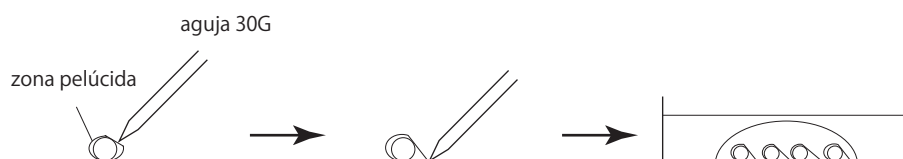
Terminado


DPZ

1. Recolecte los ovocitos de los oviductos de hembras superovuladas 14-15 horas después de la inyección con hCG. Denude los ovocitos con hialuronidasa. (Consulte a los capítulos de Fertilización *in vitro* en la página 9 y preparación de ovocitos micro-diseccionados con laser en página 37.)
2. Coloque los ovocitos desnudos en la parte superior de la gota de 10 μL de sacarosa 0.3 M (BSA-) en una placa.
3. Cuando los ovocitos se hundan al fondo de la placa, cubra la gota con aceite mineral.

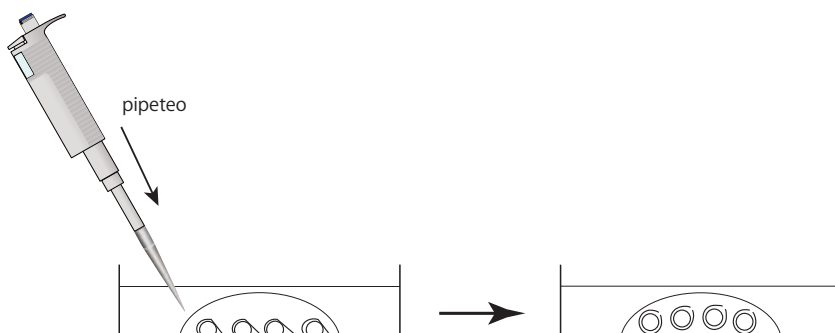


4. Bajo un microscopio binocular, diseccione parcialmente la zona pelúcida (DPZ) de los ovocitos mediante un simple movimiento hacia abajo con una aguja 30 G.



[DPZ] No. 09-01 

5. Después de la DPZ, neutralice la atracción electrostática entre la zona pelúcida y la superficie de la placa adicionando a la gota 20 μL de sacarosa 0.3 M (BSA+).
6. Para despegar los ovocitos con DPZ de la superficie del fondo de la placa, rocíe los ovocitos con una solución de sacarosa usando una micropipeta.



7. Lavar con cuidado los ovocitos con DZP 3 veces en MEDIO CARD® para remover el resto de sacarosa.

Comentario

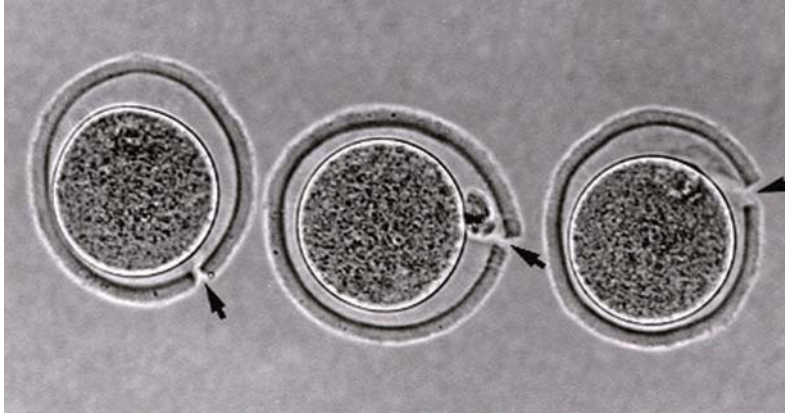
Cuando se ponen los ovocitos en una solución de sacarosa 0.3M (BSA-), el ooplasma se contrae por las fuerzas osmóticas y ocurre una interacción electrostática entre la zona pelúcida de los ovocitos y la superficie de la placa.

Como resultado. El espacio perivitelino se ensancha y los ovocitos se adosan al fondo de la placa.

Comentario

El rociado debe aplicarse desde el lado opuesto al corte para prevenir que los ovocitos escapen fuera de la zona pelúcida.

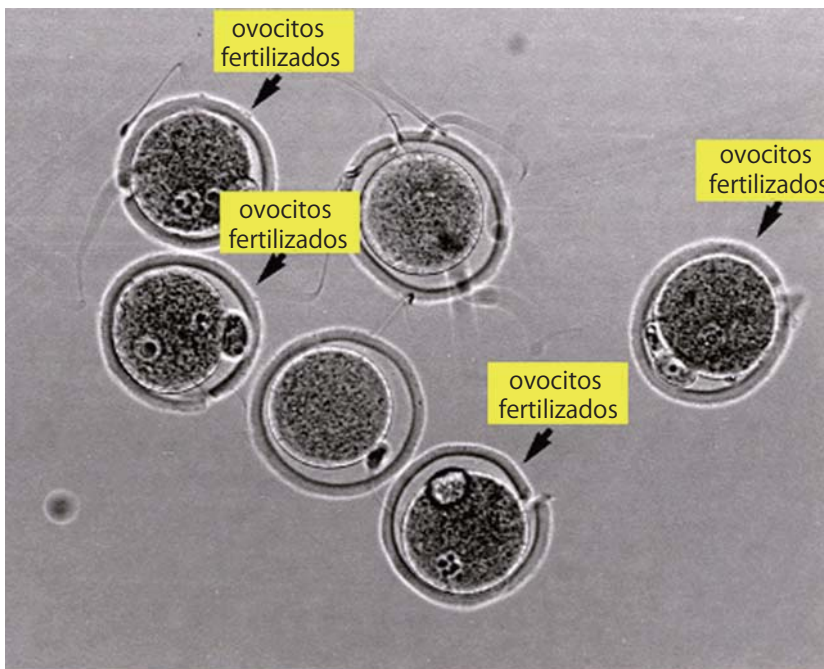
[Microfotografía: Ovocitos DZP]



Fertilización *in vitro* y transferencia embrionaria

1. Coloque los ovocitos DZP en la gota de MEDIO CARD® que contiene los espermatozoides preparados previamente (inseminación).
(Por favor, consulte los capítulos de Fertilización *in vitro* en la página 6. Fertilización *in vitro* usando espermatozoides epididimarios transportados en frío en la página 18 y Fertilización *in vitro* usando espermatozoides criopreservados en la página 26.)
2. Lave los ovocitos fertilizados, con cuidado, dos veces en mHTF 3 horas después de la inseminación, luego póngalos en cultivo por 3 días hasta que se desarrollen al estadio de blastocisto temprano.

[Microfotografía: Ovocitos fertilizados]



3. Transfiera los blastocistos tempranos a los cuernos uterinos de una receptora con una pseudopreñez de 3 días (Día 1 es el día en que se observa el tapón vaginal).
Por favor, consulte el capítulo de transferencia embrionaria en útero en la página 72.

Referencias

1. Nakagata N., Okamoto M., Ueda O., and Suzuki H. 1997. The positive effect of partial zona-pellicular dissection on the *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biol. Reprod.* 57: 1050-1055.

Comentario

Si los embriones en estadio de 2-celulas son transferidos en el oviducto de una receptora en el día 1 de pseudopreñez, el porcentaje de desarrollo a animales nacidos será muy baja.

Esto se debe a que los blastómeros que conforman los embriones escapan de la zona pelúcida por la acción peristáltica del oviducto en su paso a través del oviducto hacia el útero.

4-3 Recolección de embriones en estadio de 2-Celulas

Materiales y equipo

1. Pinzas de relojero #5
2. Tijeras de disección
3. KSOM/AA
4. Aceite mineral
5. Placas plasticas (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
6. Jeringas de 1 mL
7. Aguja de lavado (aguja 30G de punta roma)
8. Pipetas de transferencia

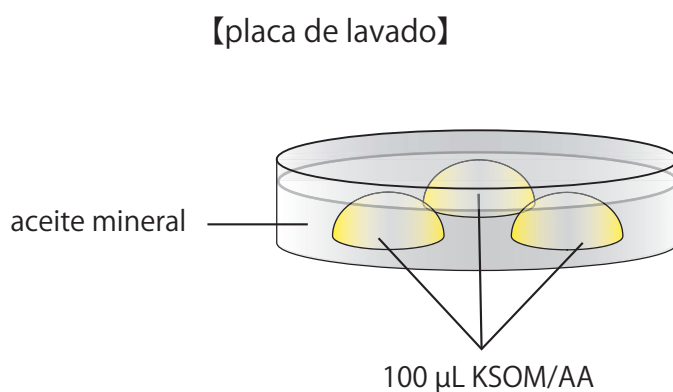
Procedimientos

Superovulación y selección de las hembras con tapón

1. Inyecte las hembras (de 8-12 semanas de edad) i.p con 7.5 IU de PMSG (14:00-18:00).
2. Inyecte las hembras i.p. con 7.5 IU de hCG 48-52 horas después de la inyección de PMSG.
3. Verifique los tapones vaginales a la mañana siguiente.
(Por favor, consulte el capítulo de Transferencia embrionaria en oviducto en la página 66.)

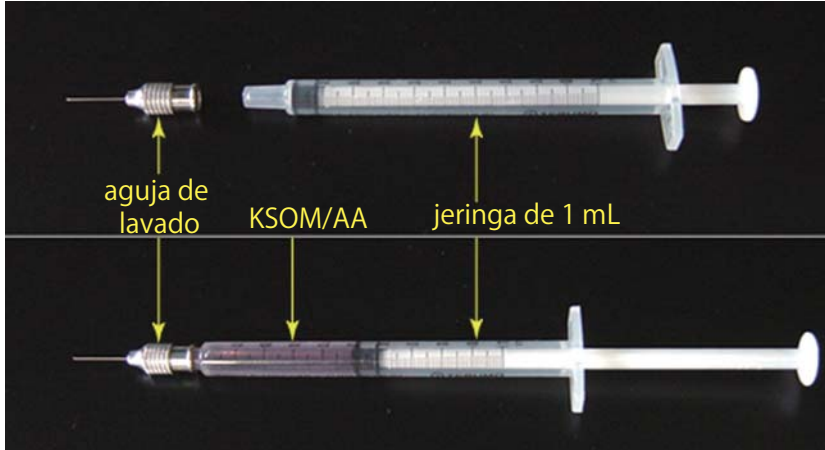
Preparación de las placas

1. Coloque 3 gotas (100 μ L / gota) de KSOM/AA en una placa y cúbralas con aceite mineral. Ponga la placa en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por un mínimo de 30 minutos.



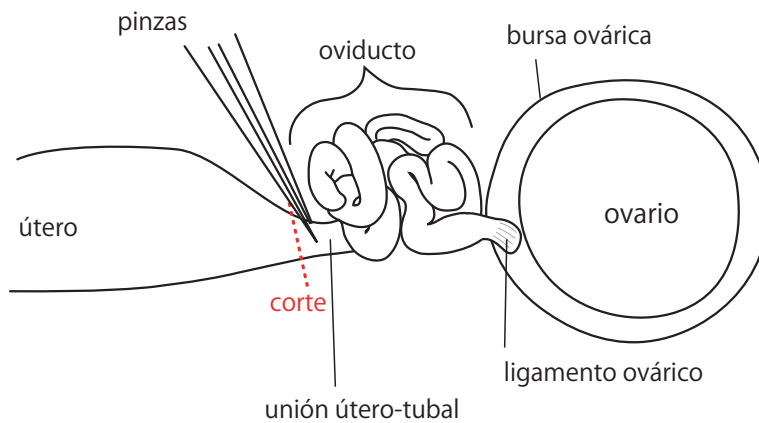
Preparación de la aguja de lavado

1. Llene una jeringa con medio KSOM/AA y conecte una aguja de lavado con la punta roma.
2. Pruebe la jeringa para asegurarse de que está libre de burbujas de aire, y que le KSOM/AA fluye fácilmente.

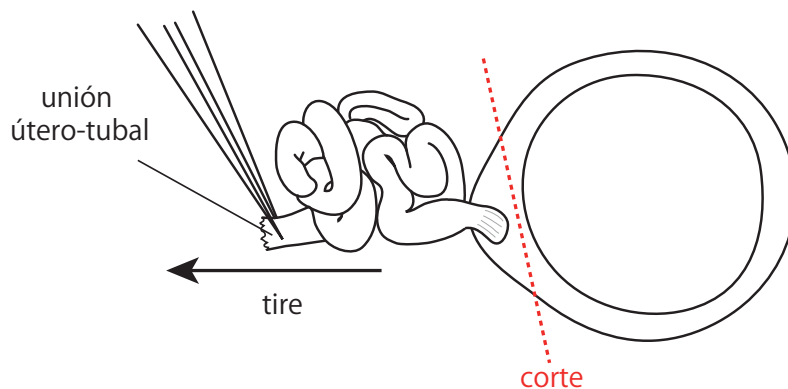


Obtención de embriones

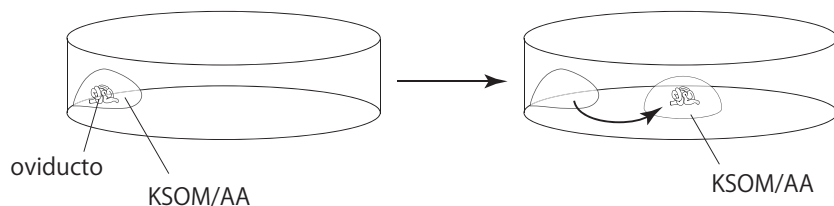
1. El día después en que se observe el tapón vaginal, obtenga el útero, oviducto y ovarios de las hembras y colóquelas sobre un papel de filtro estéril. (Por favor, consulte con el capítulo Fertilización *in vitro* en la página 9.)
2. Pince en la unión útero-tubal y haga un corte en la región uterina.



3. Tire de la unión útero-tubal para separar el infundíbulo del ovario, y corte la bursa ovárica.

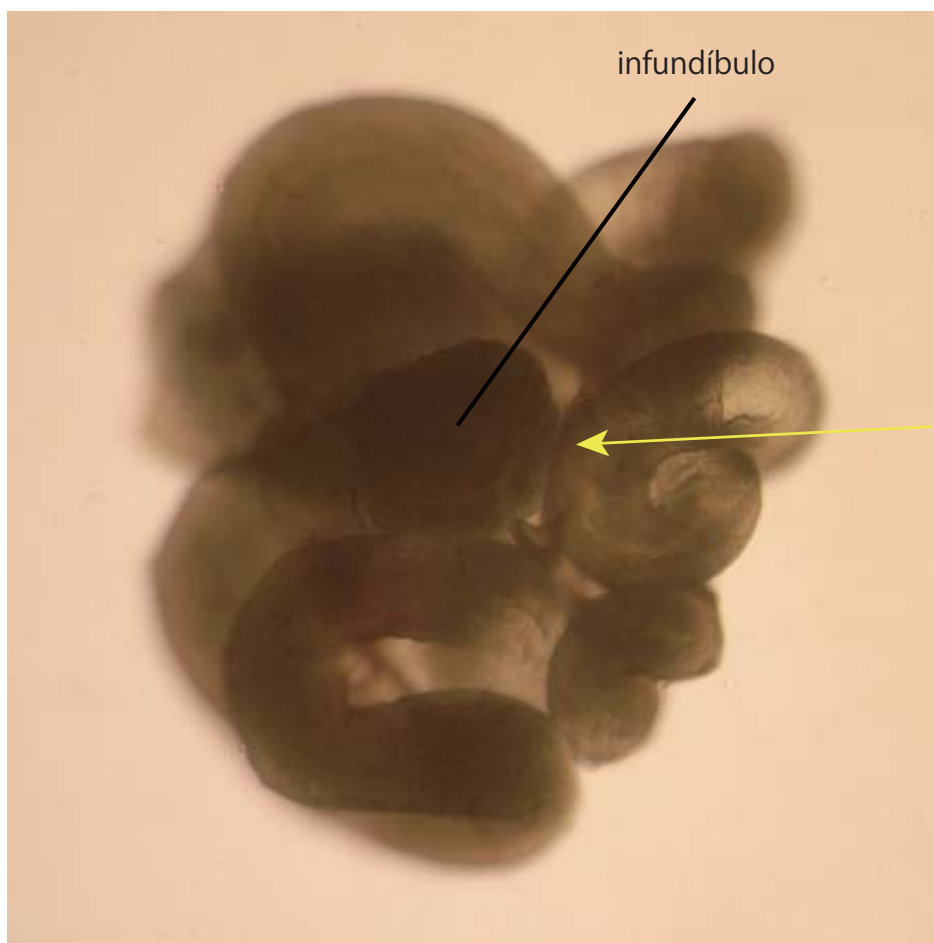


- Después de lavar el oviducto en una gota de KSOM/AA, póngalo en otra gota de KSOM/AA.



- Mire detenidamente al oviducto para ubicar el infundíbulo, que es un tubo de un diámetro mayor que el oviducto.
- Coloque el oviducto para que la aguja de lavado pueda insertarse fácilmente.

[Microfotografía: un oviducto antes de lavarlo]



- Mantenga firme el infundíbulo en el fondo de la placa usando unas pinzas e inserte la aguja en su extremo.

Nota

Como usualmente el infundíbulo se encuentra escondido entre las circunvoluciones del oviducto, se debe rotar suavemente con una pinza el oviducto y buscar con cuidado para encontrarlo.

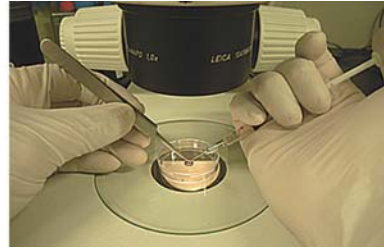
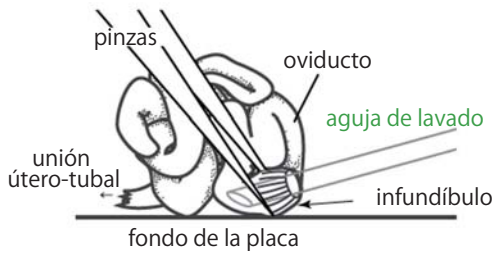
Comentario

Si usted es diestro, coloque el oviducto como lo muestra el diagrama inferior. Es más fácil insertar la aguja en el infundíbulo con esta posición.

Nota

El infundíbulo es extremadamente frágil, de manera que use las pinzas con cuidado.

8. Empuje el embolo y despacio lave el oviducto con KSOM/AA.

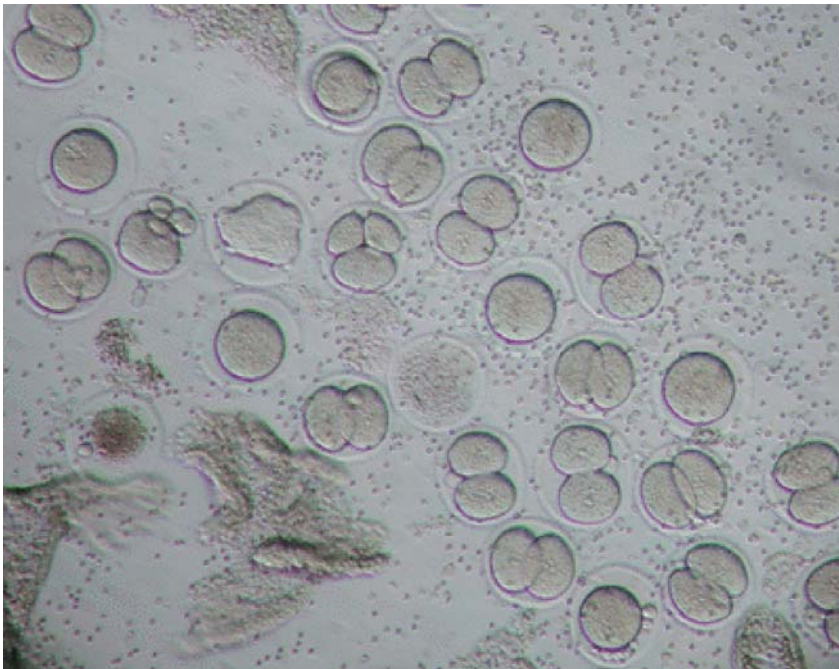


[lavado] No. 10-01



9. Utilizando una pipeta aspire los embriones y lávelos pasándolos por varias gotas de KSOM/AA (placa de lavado).

[Microfotografía: oviducto luego del lavado]



Nota

Cuando el lavado se hace correctamente, se debería ver como el oviducto se infla a medida que se inyecta el medio.

No pinche a ciegas el oviducto si no se puede encontrar el infundíbulo.

Haciendo eso puede destruir el infundíbulo lo que impedirá insertar la aguja.

Nota

Asegúrese de completar todos los pasos, desde el sacrificio de las hembras hasta el lavado de sus oviductos en el menor tiempo posible (dentro de los 5 minutos).

Además, cuando esté trabajando solo, no sacrifique muchos ratones a la vez, es mejor sacrificar uno y lavar sus oviductos antes de pasar a la siguiente hembra.

Referencias

1. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (Third edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-591-9.