

5-1 Transporte en frío de embriones a 2-células

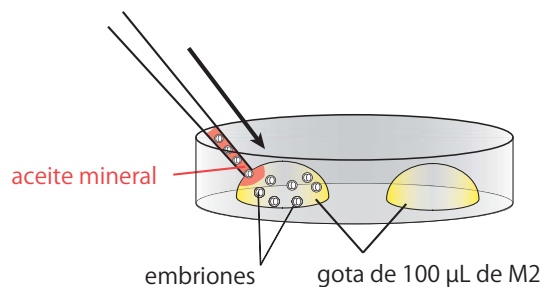
Materiales y equipo

1. Embriones a 2-celulas (adaptable a embriones frescos y congelados)
2. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
3. Punta de pipeta para cargar geles (Cat. No. 010-R204S; Bio Medical Instrument)
4. M2 (Cat. No. M7167; Sigma)
5. Tubos de 0.5 mL (Fisherbrand Flip Cap Microtubes 0.5 mL; Fisher Scientific Cat. No. FS-MCT-060-C)
6. Pipetas de transferencia
7. KSOM/AA
8. Aceite mineral
9. Registrador de datos de temperatura (Thermochron iButton Cat. No. DS1921G; Maxim Integrated Products)
10. Kit para transporte en frío CARD (Cat. No. KYD-006-EX; Cosmo Bio Co., Ltd.)
 - Termo (Cat. No. JMK-501; Thermos K.K.)
 - Caja de papel (in which a 0.5 mL tube can stand)
 - Algodón
 - Bloques de gel refrigerante (pequeño y grande)
 - Caja de transporte de poliestireno (Cat.No. KC-3; KARUX)

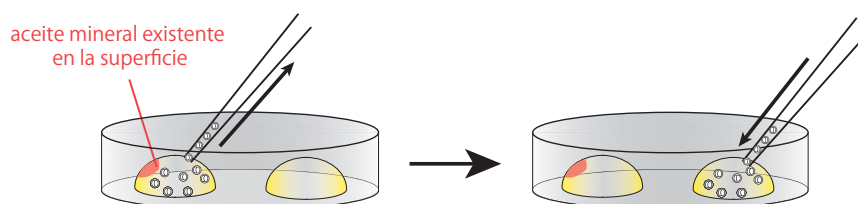
Procedimientos

Mantenimiento en frío de embriones a 2-celulas

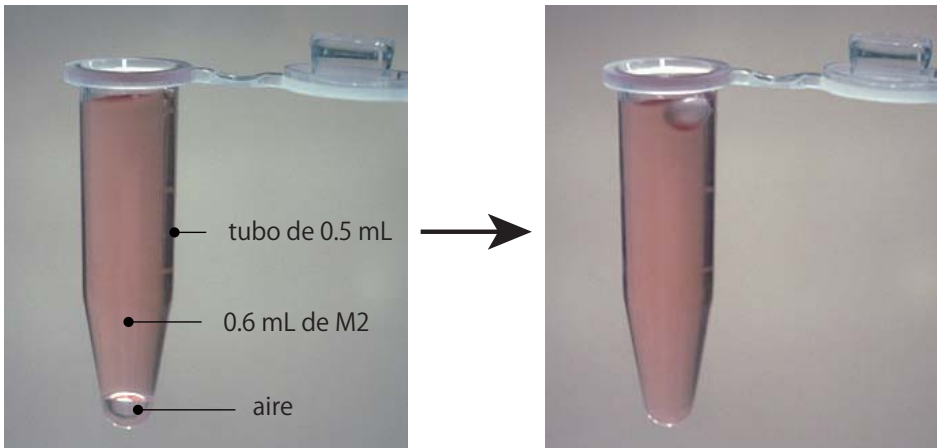
1. Ponga en una placa de plástico dos gotas de 100 μ L de M2.
2. Transfiera los embriones a 2-celulas del medio de cultivo a la gota de M2.



3. Cambie la pipeta capilar para la manipulación de embriones y aspire los embriones con un capilar nuevo, asegurándose de evitar acarrear aceite mineral a la gota de M2. Transfiera los embriones a la gota de M2 preparada en el paso 1.



- Llene un tubo de 0.5 mL con 0.6 mL de M2 a temperatura ambiente. Si hubiera una burbuja en fondo del tubo, golpee en la punta para que se desprenda.



- Recoja y transfiera los embriones al fondo del tubo (40 embriones/tubo).



- Coloque en la caja de papel el tubo con los embriones, el registrador de datos de temperatura y el algodón.



- Coloque la caja de papel en el refrigerador (4-8°C).

Comentario

Los embriones mantendrán la capacidad de desarrollo por un máximo de 72 horas.

Embalaje y transporte de embriones a 2-celulas

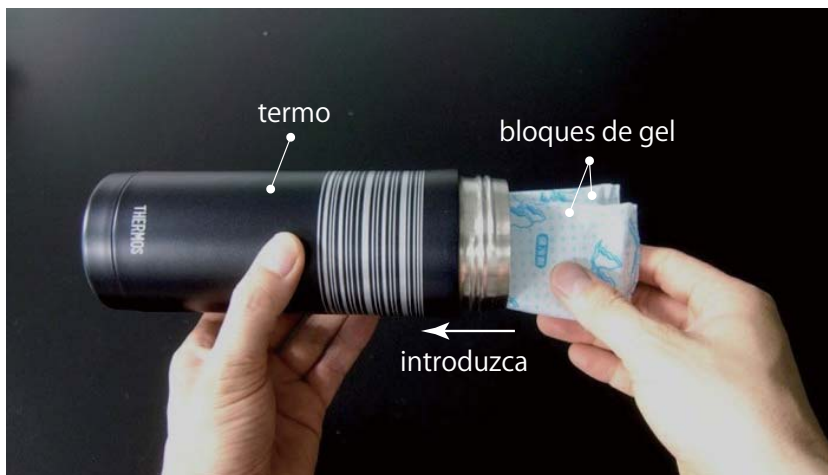
Prepare una caja de papel con los embriones de 2-celulas de la misma forma que se describió anteriormente (Mantenimiento en frio de embriones de 2-celulas)

Los bloques de gel frio (grandes) y la caja de transporte de poliestireno debe ser enfriada a 4-8°C antes de su uso. Use los bloques pequeñas de gel y el termo a temperatura ambiente.

1. Introduzca la caja de papel con los embriones dentro del termo.



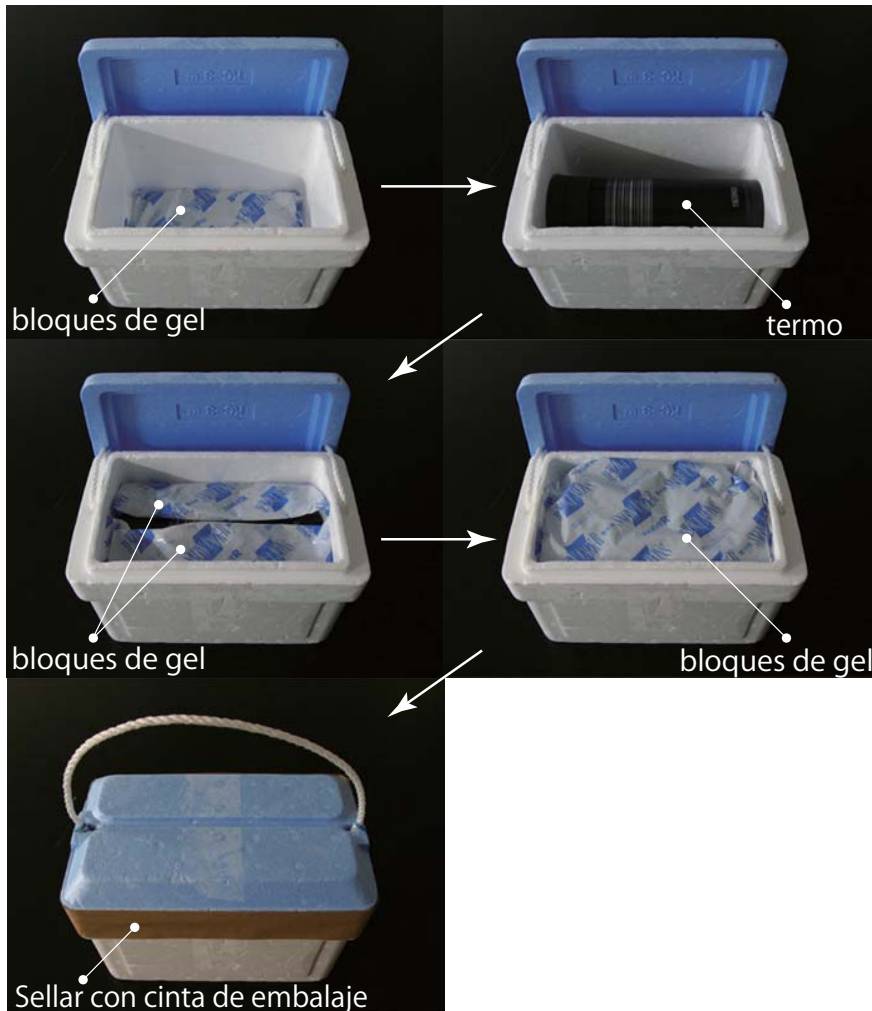
2. Introduzca dos bloques pequeños de gel frio dentro del termo.



3. Tape el termo.



4. Coloque un bloque grande de gel en el fondo de la caja de transporte, luego coloque el termo sobre ella.
5. Ponga un bloque grande de gel a cada lado del termo, después coloque uno más (grande) encima del termo y tape la caja.
6. Selle la tapa de la caja de transporte usando cinta de embalaje.



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

Nota

Tenga cuidado de no colocar la caja de papel boca abajo.

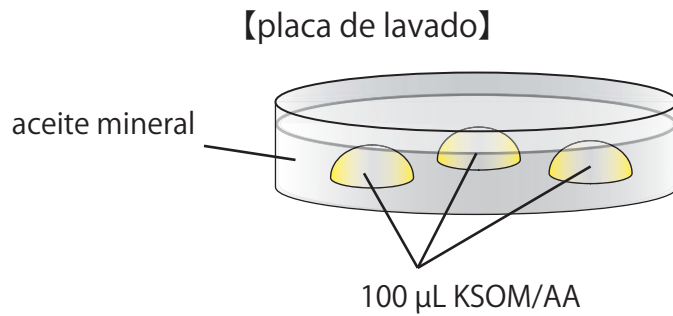
Nota

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

Esto es para proteger el termo durante el transporte.

Recuperación de los embriones de 2-celulas de la caja de transporte

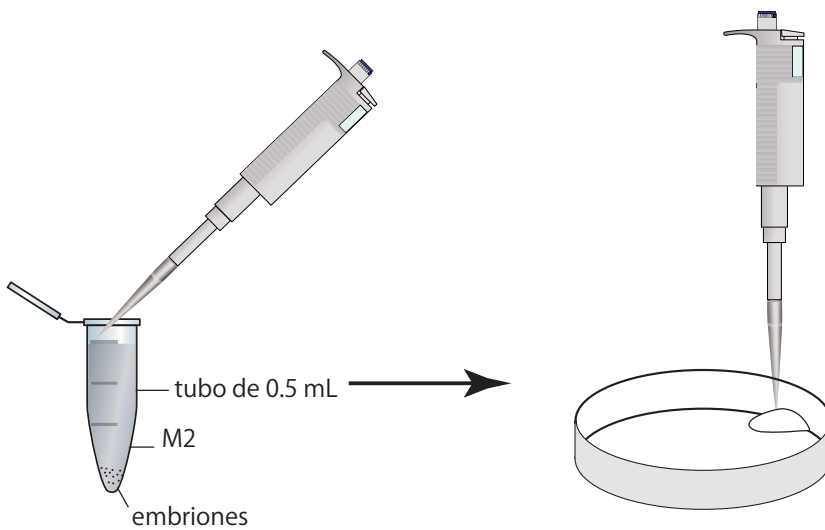
1. Ponga 3 gotas de (100 µL / gota) de KSOM/AA en una placa y cúbrala con aceite mineral. Coloque la placa en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por un mínimo de 30 minutos.



2. Retire del termo la caja de papel con los embriones.
3. Deje la caja de papel a temperatura ambiente por 30 minutos.

[Retirando la muestra] No. 11-01

4. Abra la caja de papel y con cuidado retire el algodón. Una vez quitado, saque y abra el tubo con los embriones.
5. Recoja 200 µL del M2 de la capa superior del tubo usando una punta de pipeta para cargar geles y transfiera la alícuota al borde de una placa.



Nota

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

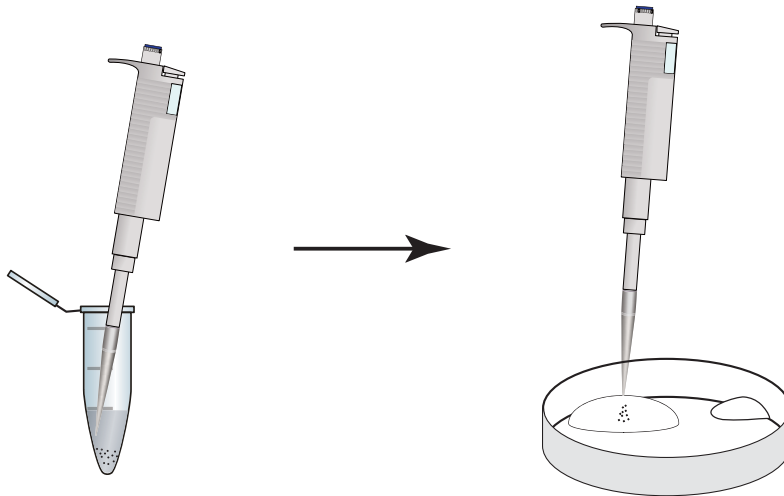
Comentario

Los embriones mantendrán su capacidad de desarrollo por un máximo de 72 horas.

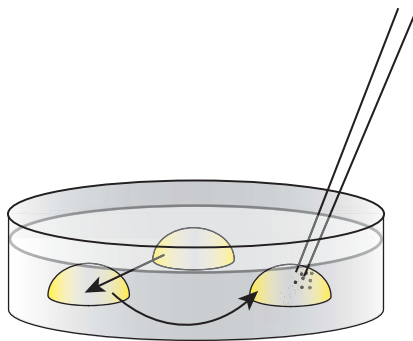
Comentario

Los embriones se hundirán al fondo del tubo durante esos 30 minutos.

- Con cuidado recupere desde el fondo del tubo todo el medio M2 que contiene los embriones usando una punta para cargar geles, y transfiera la alícuota al centro de la placa.



- Saque los embriones del M2, transfiera y lávelos en cada una de las 3 gotas de 100 μL de KSOM/AA (placa de lavado).



- Transfiera los embriones a los oviductos de un ratón hembra pseudopreñada.

Referencias

- Takeo T., Kaneko T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Machida H., Koga M., Nakagawa Y., Takeshita Y., Matsuguma T., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Nakatsukasa E., Nomaru K., and Nakagata N. 2009. Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology*. 58(2): 196-202.
- Takeo T., Kondo T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Nakagawa Y., Takeshita Y., Nakamura Y., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Fujikawa R., Nomaru K., Kaneko T., Itagaki Y., and Nakagata N. 2010. Short-term storage and transport at cold temperatures of 2-cell mouse embryos produced by cryopreserved sperm. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 49(4): 415-419.

Nota

Para una manipulación fácil, tenga cuidado de evitar las burbujas en la punta de pipeta.

Nota

Si no puede recuperar todos los embriones, enjuague el interior del tubo usando 200 μL de M2 en el borde de la placa.

Comentario

Idealmente, la transferencia embrionaria en hembras pseudopreñadas debería llevarse a cabo inmediatamente después de la llegada de los embriones.

(Por favor, consulte al capítulo de Transferencia embrionaria en oviducto en la página 66.)

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

Materiales y equipo

1. Sacarosa 0.8 M
2. PB1
3. KSOM/AA
4. Bolsa plástica
5. Termo
6. Hielo picado
7. Criotubos con fondo conico (Cat. No. 366656; NUNC)
8. Placa de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)

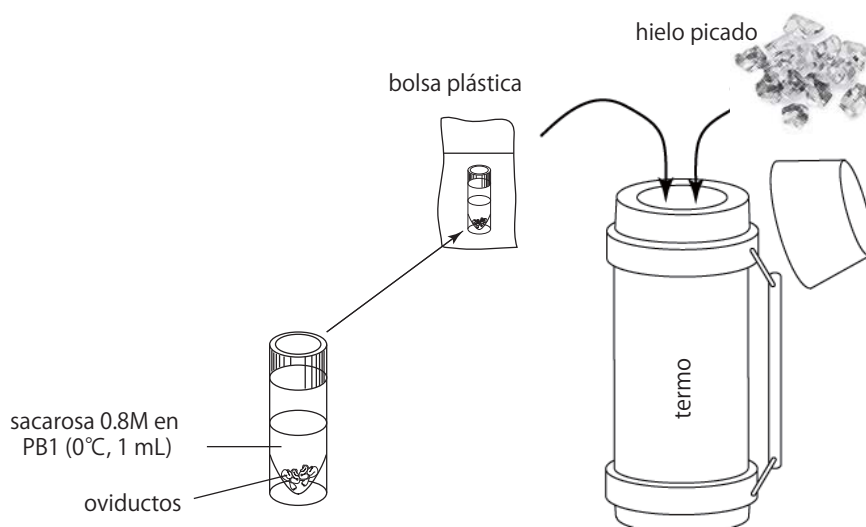
Procedimientos

Disección de los oviductos de una hembra superovulada y con tapón

1. Inyecte las hembras i.p. (8-12 semanas de edad) con 7.5 UI de PMSG (14:00-18:00).
2. Inyecte las hembras i.p. con 7.5 UI de hCG 48-52 horas después de administrarles la inyección de PMSG, y aparee machos y hembras durante la noche.
3. Temprano a la mañana y hasta el mediodía del día siguiente revise las hembras si tienen tapón vaginal. (Por favor, consulte al capítulo de Transferencia embrionaria en oviducto en la página 66.)
4. En 44-46 horas después de la administración de hCG, sacrifique la hembras con tapón.
5. Extraiga los oviductos de las hembras y colóquelos en una gota de 100-200 μL de sacarosa 0.8 M (0°C). (Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 9.)

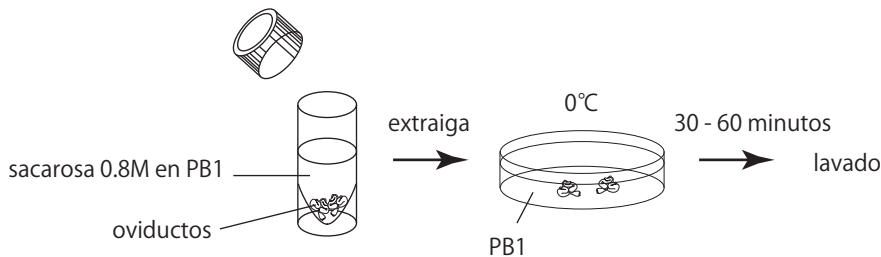
Transporte de los oviductos de ratón

1. Transfiera los oviductos en un criotubo que contenga 1 mL de sacarosa 0.8M (0°C).
2. Ponga el tubo en una bolsa plástica y séllela usando sellador por calor.
3. Coloque la bolsa plástica en un termo que contenga hielo picado y envíelo usando un servicio de puerta a puerta.



Obtención de embriones

1. Retire el tubo del termo.
2. Retire los oviductos del tubo y manténgalos en PB1 (0°C) por 30-60 minutos.
3. Lave los oviductos con PB1 (0°C). (Por favor, consulte al capítulo de Obtención de embriones en estadio de 2-celulas en la página 42.)
4. Lave los embriones 3 veces en gotas de KSOM/AA (37°C).



Referencias

1. Kamimura E., Nakashima T., Ogawa M., Ohwada K., and Nakagata N. 2003. Study of low-temperature (4°C) transport of mouse two-cell embryos enclosed in oviducts. *Comp. Med.* **53**: 393-396.
2. Ogawa M., Fuchiwaki M., Valdez Jr. Delgado M., Yanagita T., Ide Y., Fukumoto K., Machida H., Kawabe T., Kaneko T., Kasai M., and Nakagata N. 2005. Development after freeze-thawing of mouse embryos collected from oviducts transported at 0°C. *Exp. Anim.* **54**(3) Suppl: 242.

Nota

Los embriones se degeneraran rápidamente si elimina el paso 2.

Nota

Los oviductos no deben permanecer en el tubo más de 48 horas o los embriones se degeneraran. Los embriones deben ser congelados si no se utilizaran inmediatamente.

(Por favor, consulte al capítulo de vitrificación simple de embriones de ratón en la página 54.)

6-1 Vitrificación simple de embriones de ratón

Materiales y equipo

- 1 M DMSO
- DAP213
- Placa de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
- Filtro (Millex-GV 0.22 μm Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
- Punta de pipeta para cargar geles (MBP Gel 200, Cat. No. 3621; Molecular BioProducts)
- Pipetas de transferencia
- Criotubos (Se recomienda el Cryogenic Vials Cat. No. MS-4501W; Sumitomo Bakelite, Japan. Si no puede obtenerlo, use Cat. No. 366656; NUNC.)
- Micropipeta
- Caña de viales o tubos
- Nalgene Labtop Cooler (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA)
- Nitrógeno líquido
- Microscopio
- Sacarosa 0.25 M
- KSOM/AA
- Aceite mineral

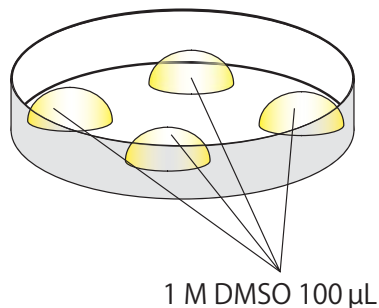
Procedimientos

Preparación del bloque refrigerante y de los criotubos

1. Un día previo a su uso coloque el bloque refrigerante (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA) en un congelador a -20 .
2. Unos 10 minutos antes de comenzar la vitrificación saque el bloque refrigerante del congelador.
3. Ponga algunos criotubos en el bloque refrigerante. Unos 40 embriones por criotubo es fácil de manipular, en otras palabras, cuando se quiera vitrificar 120 embriones, se debería colocar tres tubos en el bloque refrigerante.
4. Justo antes de comenzar el procedimiento, verifique que la temperatura dentro de los tubos esta a 0°C .

Vitrificación

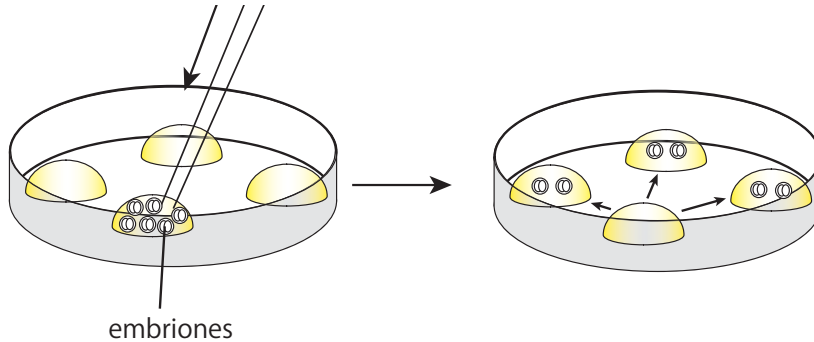
1. Filtre el DMSO 1M y ponga 4 gotas ($\sim 100 \mu\text{L}$ /gota) en una placa. Una gota es para lavar los embriones sacados del medio de recolección, mientras que las otras es para contener los embriones lavados.



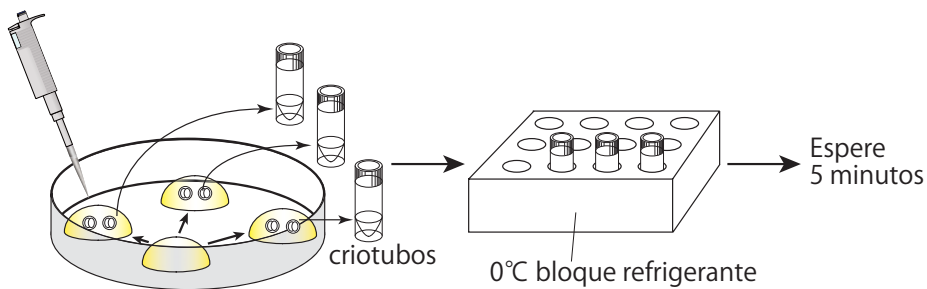
Comentario

Se puede usar hielo picado en lugar del bloque refrigerante.

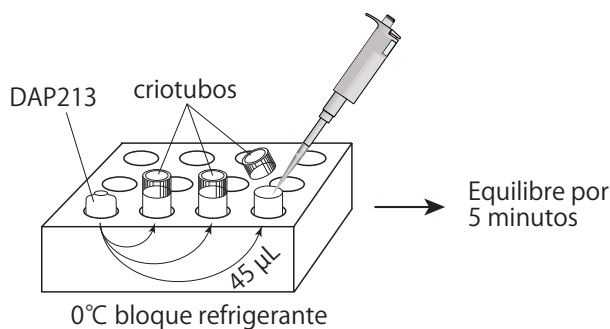
2. Coloque un grupo de embriones en una de las 4 gotas para enjuagarlos del medio de recolección. Distribuya los embriones ya enjuagados en partes iguales entre las otras gotas. Estas alícuotas eventualmente serán transferidas al criotubo. Por ejemplo, si uno tuviera que recolectar 120 embriones y vitrificarlos en alícuotas de 40 embriones, los embriones serían colocados primero en la gota de enjuague y luego se dividen equitativamente entre las 3 otras gotas.



3. Usando un pipeta de 20 μL y una punta para cargar geles, transfiera los embriones contenidos en 5 μL de la solución de DMSO 1M a un criotubo. Una vez transferidos, coloque el criotubo en el bloque refrigerante a 0°C y espere 5 minutos.



4. Agregue 45 μL de la solución crioprotectora (DAP213) a 0°C al criotubo y equilibre por 5 minutos en el bloque refrigerante a 0°C.



Nota

Es posible mantener los criotubos en el bloque refrigerante por más tiempo que 5 minutos (<20 minutos).

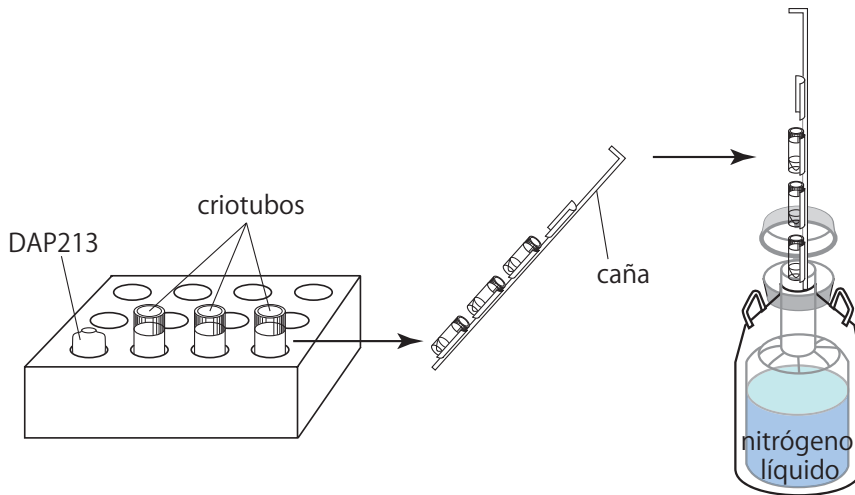
Nota

Si los embriones son agrupados en el centro de la gota, es más fácil aspirarlos todos juntos en 5 μL de la solución de DMSO 1M.

Nota

No ajusten con fuerza la tapas de los tubos después de agregarle el DAP213, sino, será muy difícil quitarla rápidamente cuando las muestras sean extraídas del tanque de nitrógeno.

- Rápidamente ponga los criotubos en una caña de aluminio y sumerja directamente las muestras en el nitrógeno líquido.



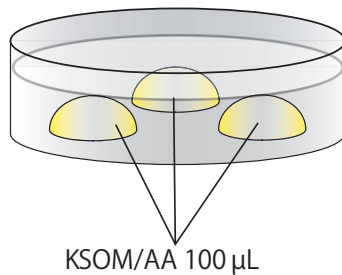
[Vitrificando embriones] No. 13-01



Preparación para el descongelado

- Ponga 3 gotas (100 μ L/gota) de KSOM/AA en una placa y cúbralo con aceite mineral. Coloque la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por al menos 30 minutos.

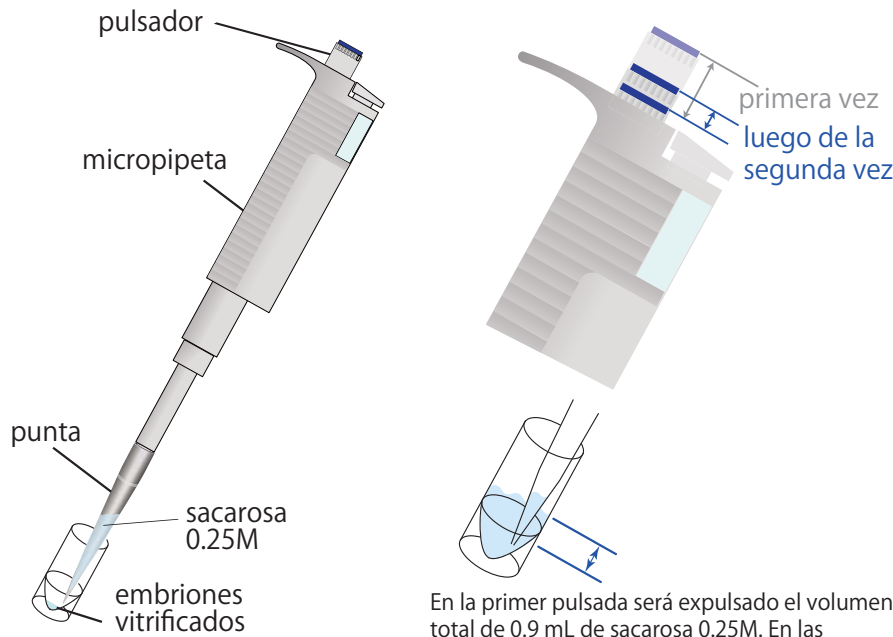
【placa de lavado】



- Caliente una solución de sacarosa 0.25M en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) antes de su uso.

Recuperación de embriones vitrificados

- Saque del nitrógeno líquido la muestra elegida y abra la tapa del criotubo. Descarte todo resto de nitrógeno líquido que haya en el tubo y déjelo a temperatura ambiente por 30 segundos.
- Agregue al criotubo 0.9 mL de sacarosa 0.25M (precalentado a 37°C) y descongele la muestra rápidamente pipeteando las soluciones. Cuando pipetee tenga cuidado de no generar mucha cantidad de burbujas y de no dañar físicamente los embriones pipeteando muy rápido. Una vez descongelado, transfiera el contenido del criotubo a una placa de cultivo.



La punta de pipeta no deberá tocar el fondo del criotubo. Si lo hiciera, la sacarosa 0.25M que se encuentra en la punta se congelara y no podrá descargar la solución en el tubo.

En la primer pulsada será expulsado el volumen total de 0.9 mL de sacarosa 0.25M. En las pulsadas subsiguientes, se limita la presión a cerca de un decimo del volumen de sacarosa 0.25M que se ha aspirado serán expulsados. De esta forma pipeteando volúmenes pequeños se previene la formación de burbujas en la solución de sacarosa.

3. Coloque unos 0.4-0.5 mL de sacarosa 0.25M mas en el criotubo y transfiera el contenido a una placa. Esto diluye aun más el crioprotector y asegura que todos los embriones hayan sido transferidos.

[Recuperación de embriones vitrificados]

No. 13-02

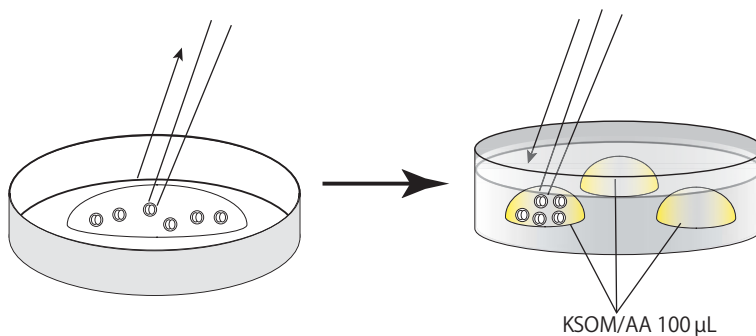


[Pipeteando para recuperar los embriones vitrificados]

No. 13-03



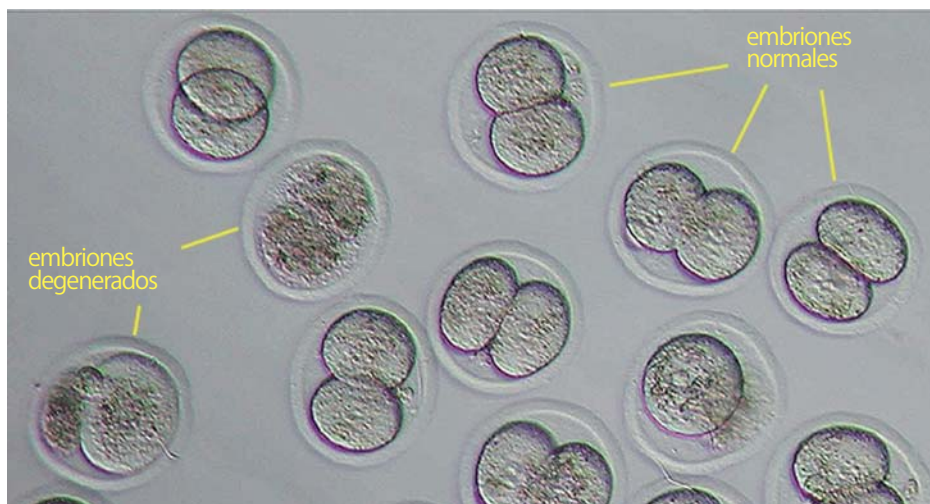
4. aspire los embriones del medio y cuidadosamente transfíralos a una gota de KSOM/AA (placa de lavado), después manténgalos en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire).



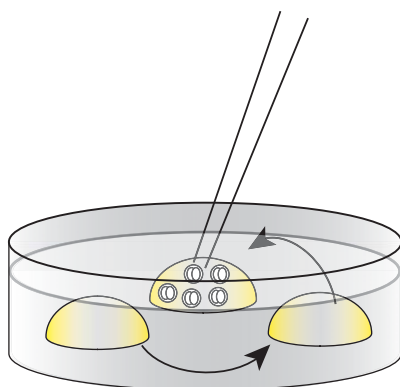
Nota

Es muy importante descongelar rápidamente la muestra para evitar dañar los embriones con la toxicidad de la solución crioprotectora (DAP213).

[Microfotografía: Embriones recuperados después de la vitrificación]



- Después de 10 minutos, lave los embriones pasándolos consecutivamente por 2 gotas de KSOM/AA (placa de lavado).



Referencias

- Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.* **87**: 479-483.
- Nakagata N. 1993. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization between cryopreserved gametes. *J. Reprod. Fert.* **99**: 77-80.
- Nakagata N. 1995. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp. Anim.* **44**: 1-8.
- Nakao K., Nakagata N., and Katsuki M. 1997. Simple and efficient procedure for cryopreservation of mouse embryos by simple vitrification. *Exp. Anim.* **46**: 231-234.

6-2 Vitricación simple de ovocitos de ratón

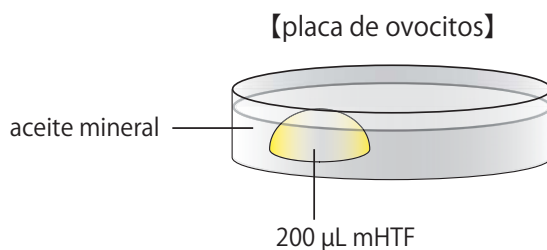
Materiales y equipo

1. Ratones hembras superovuladas con PMSG y hCG
2. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
3. Aceite mineral
4. Micropipeta
5. Puntas de pipeta
6. mHTF
7. Hialuronidasa 1% en mHTF
8. Suero fetal bovino (FBS Cat. No. 26140-087; Gibco)
9. Filtro (Millex-GV 0.22 μm Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
10. Capilares de vidrio para la manipulación de embriones
11. Incubador humidificado (37°C , 5% CO₂ en aire)
12. Materiales y equipo usado para la vitricación y descongelamiento de los embriones (Para el lavado de ovocitos descongelados se utilizan gotas de mHTF) (Por favor, consulte al capítulo de vitricación simple de embriones de ratón en la página 54.)

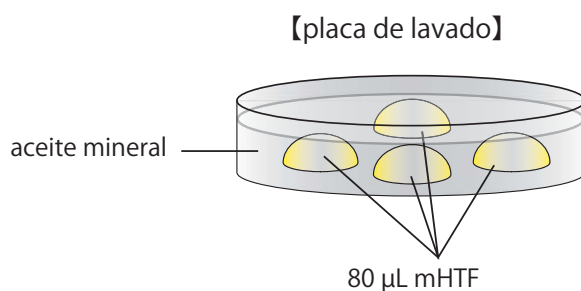
Procedimientos

Preparación de las placas

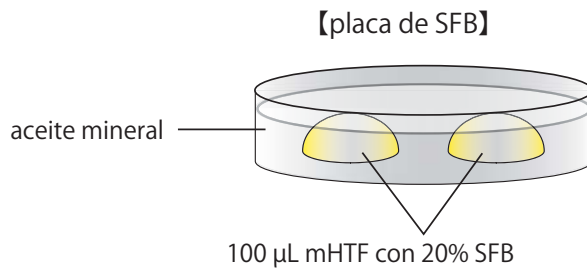
1. Coloque un agota de 200 μL de mHTF en una placa. Cúbrala con aceite mineral y colóquela en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) al menos durante 30 minutos.



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

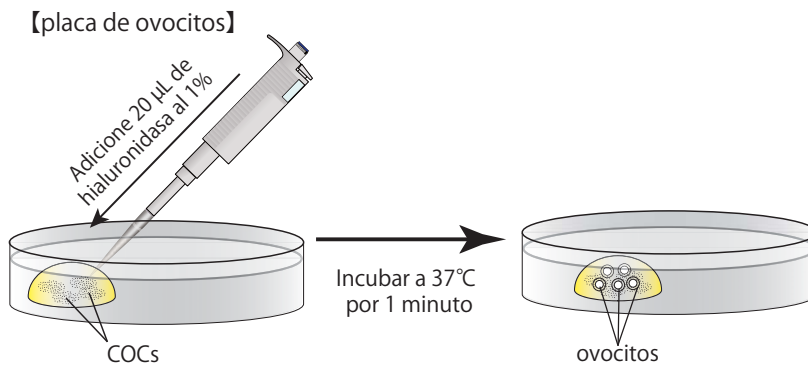


3. Prepare mHTF con 20% de SFB, esterilícelo por filtración. Ponga 2 gotas (100 μ L/gota) del medio en una placa. Cúbralo con aceite mineral y colóquelo en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) al menos durante 30 minutos.

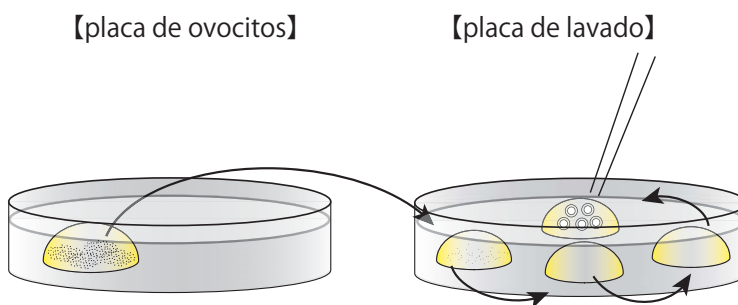


Preparación de los ovocitos denudados

1. Obtenga de un ratón hembra superovulada los complejos ovocitos-cúmulos (COCs) y colóquelos en una gota de 200 μ L de mHTF (Placa de ovocitos). (Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 9.)
2. Añada a la gota de mHTF que contiene los COCs 20 μ L de hialuronidasa al 1% y mantenga la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por 1 minuto.



3. Rápidamente recolecte y transfiera los ovocitos a una gota de 80 μ L de mHTF (Placa de lavado), lávelos pasándolos por las gotas en la placa de lavado.



Nota

Asegúrese de llevar a cabo todas las operaciones, desde el sacrificio de la hembra para obtener sus oviductos hasta introducir los COCs en la gota de mHTF (placa de ovocitos) en el menor tiempo posible (dentro de 30 segundos).

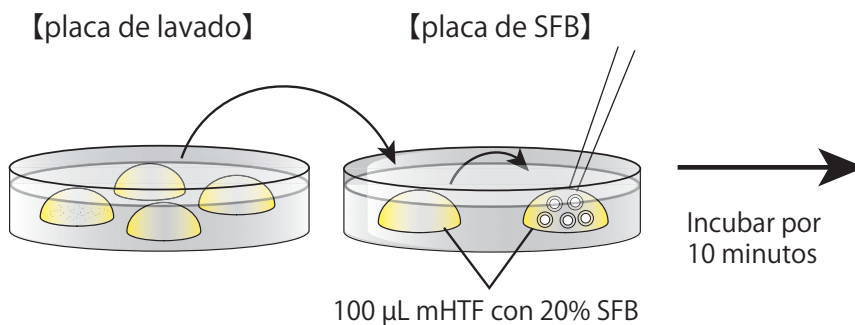
Más aun, cuando trabaje solo, no sacrifique muchos ratones a la vez; es preferible sacrificar uno y rápidamente obtener los oviductos antes de continuar con el ratón siguiente.

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.

Cultivo de ovocitos en una gota con SFB

1. Transfiera los ovocitos a la primer gota de la placa SFB para enjuagarlos. Después, transféralos a la segunda gota para incubarlos (37°C , 5% CO₂ en aire) por 10 minutos.



Vitrificación simple de ovocitos de ratón

1. Los ovocitos pueden ser vitrificados usando el método de vitrificación para embriones. Se han de remover las células del cúmulo y cultivarlos en una gota que contenga SFB. Más aun, el método de descongelamiento es el mismo que para los embriones. Por favor, consulte el capítulo de Vitrificación simple de embriones de ratón en la página 54.

Fertilización *in vitro* usando ovocitos vitrificados-descongelados.

1. Los ovocitos vitrificados y descongelados pueden usarse para fertilización *in vitro* usando espermatozoides frescos, transportados en frío o congelados y descongelados. Consulte a 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.

References

1. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., Kondo T., Haruguchi Y., Takeshita Y., Nakamura Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Ishizuka Y., Araki K. 2013. Applications of cryopreserved unfertilized mouse oocytes for *in vitro* fertilization. *Cryobiology*. 67(2):188-92.

Comentario

El SFB ayuda a prevenir el endurecimiento de la zona pelúcida del ovocito durante la vitrificación y descongelación.

Nota

Hay tres métodos diferentes de preparar el MEDIO CARD®, dependiendo de si la fertilización *in vitro* será llevada a cabo usando espermatozoides frescos, congelados y descongelados o transportados en frío. Por favor, consulte el manual de instrucciones del MEDIO CARD®.

6-3 Vitricación y trasplante de ovarios de ratón

Materiales y equipo

1. Placas de cultivo 35-mm estériles
2. mWM
3. Donante: Ratón hembra (1 día a 30 semanas de edad)
4. Receptora: Ratón hembra de cuatro semanas (una cepa que sea histocompatible con el ovario trasplantado)
5. Anestesia
6. Tijeras de micro-disección con muelle (5 mm de hoja)
7. Pinzas de relojero #5
8. Grapa de sutura (Autoclip 9 mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador (Mik-Ron Auto-clip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
9. Placa térmica (37°C)

Procedimientos

Obtención de los ovarios

1. Sacrifique la hembra donante y extraiga sus ovarios. (Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 9.)
2. Coloque los ovarios en una placa que contenga un volumen adecuado de mWM.

Vitricación

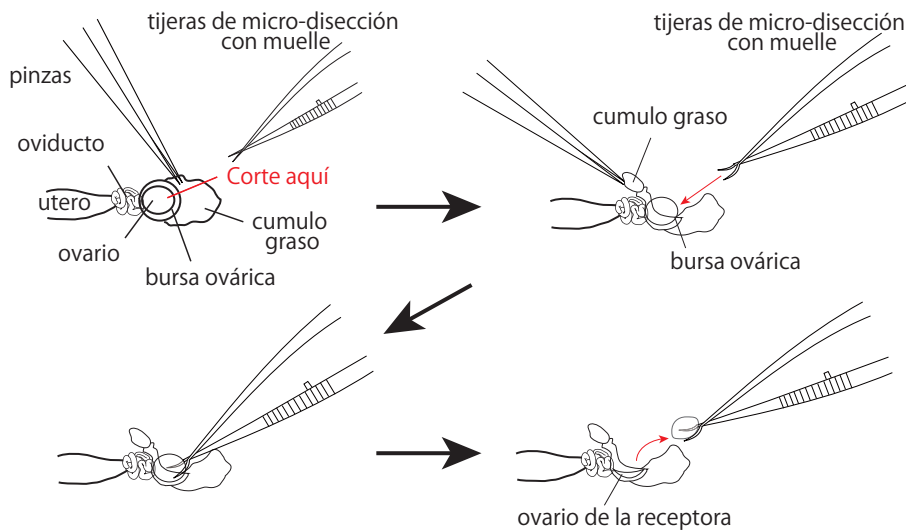
1. Los ovarios se pueden criopreservar con el mismo método usado para embriones. (Consulte al capítulo de Vitricación simple de embriones de ratón en la página 54.)

Trasplante

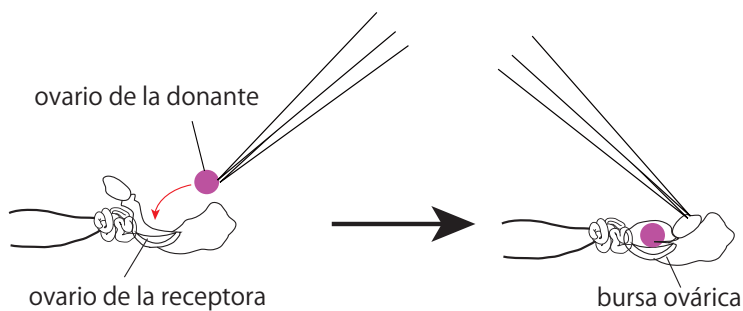
1. Anestesia la hembra receptora.
2. Extraiga el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino como en el procedimiento convencional. (Por favor, consulte al capítulo de transferencia embrionaria en oviducto en la página 67.)
3. Usando unas tijeras de micro-disección con muelle, corte aproximadamente 1/4 de la bursa ovárica de la receptora y algo de la grasa que la rodea. Levante el colgajo de grasa para poder ver el ovario.
4. Corte 1/2-2/3 del ovario usando las tijeras de micro-disección con muelle de hoja curva.

Comentario

Usando las tijeras de micro-disección con la hoja curva es más fácil colocar el ovario donante sobre el ovario residual de la receptora.



- Implante el ovario de la donante en el ovario residual de la receptora y cúbralo con la bursa ovárica.



[Trasplante de ovario de ratón] No. 15-01



- Empuje el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino dentro del abdomen y cierre la incisión usando grapas de sutura.
- Repita el mismo proceso descrito anteriormente con el otro ovario de la receptora.
- Mantenga el ratón sobre una placa térmica a 37°C hasta que se recupere de los efectos de la anestesia.

Referencias

- Migishima F., Suzuki-Migishima R., Song S.Y., Kuramochi T., Azuma S., Nishijima M., and Yokoyama M. 2003. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol. Reprod.* **68**: 881-887.
- Tsuchiyama S., and Nakagata N. 2009. Cryopreservation of ovaries from elderly female mice. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 248.

7-1 Vasectomía para la obtención de machos estériles

Materiales y equipo

1. Ratón macho (5 semanas de edad)
2. Anestésico
3. Tijeras finas
4. Pinzas de relojero #5
5. Grapa de sutura (Autoclip 9 mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador (Mik-Ron Auto-clip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
6. Placa térmica (37°C)

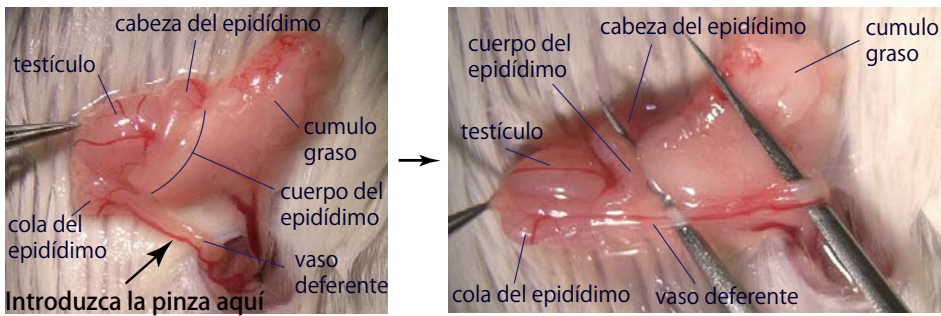
Procedimientos

Vasectomía

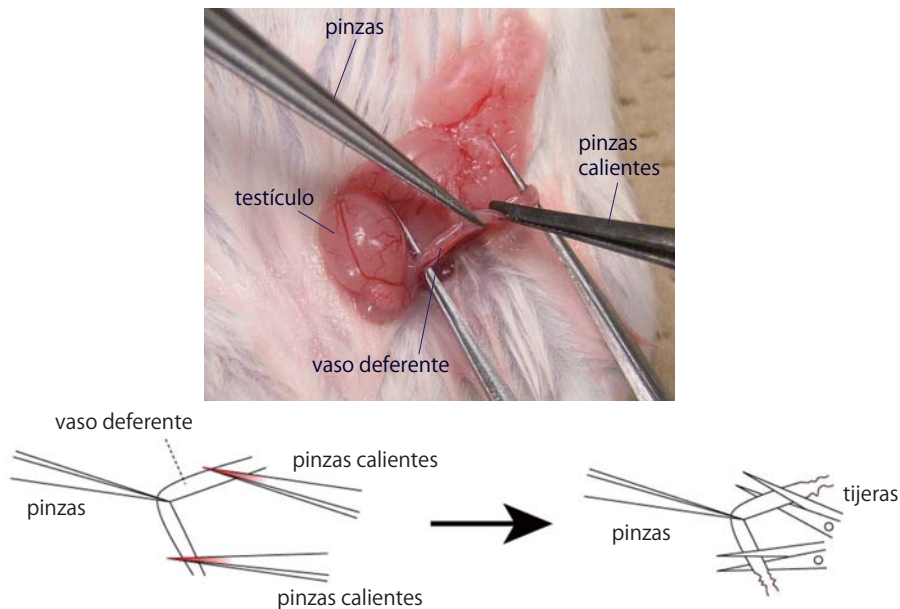
1. Anestesia un ratón macho.
2. De acuerdo con el procedimiento convencional haga una incisión en la línea media. La incisión deberá comenzar a nivel del punto superior de la pata trasera y extenderse aproximadamente 1cm de este punto hacia la cabeza del ratón. Luego de hacer la incisión, saque los testículos, el epidídimo y parte del vaso deferente de la cavidad abdominal.



- Con las pinzas levante el vaso deferente e introduzca otras pinzas por debajo para separar el vaso deferente de los otros tejidos.



- Sujete el vaso deferente con unas pinzas y cauterice el vaso en dos puntos usando unas pinzas calientes como se muestra en el diagrama de abajo.
- Corte la porción del vaso deferente que ha quedado entre las dos cauterizaciones.



- Empuje el testículo, epidídimo y parte del vaso deferente dentro de la cavidad abdominal, después cierre la incisión usando grapas de sutura.
- Repita los pasos 2-6 con el otro testículo.

Referencias

- 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.

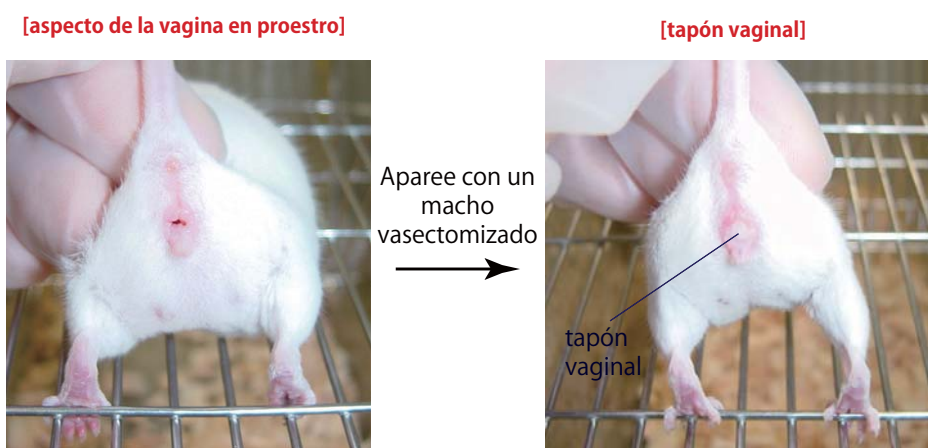
Comentario

Después de completar la cirugía, estabule cada ratón individualmente. Si el ratón es estabulado en grupo, es muy posible que peleen y puede que algunos se maten. Los machos vasectomizados estarán listos para ser empleados no antes de las 8 semanas de vida.

7-2 Transferencia embrionaria en oviducto

En nuestro laboratorio transferimos los embriones de 2-celulas a través de la pared del oviducto de las receptoras pseudo-preñadas. Este procedimiento es más fácil y simple de realizar que el procedimiento de transferencia embrionaria convencional, y es por lo tanto conveniente para técnicos sin experiencia.

Materiales y equipo

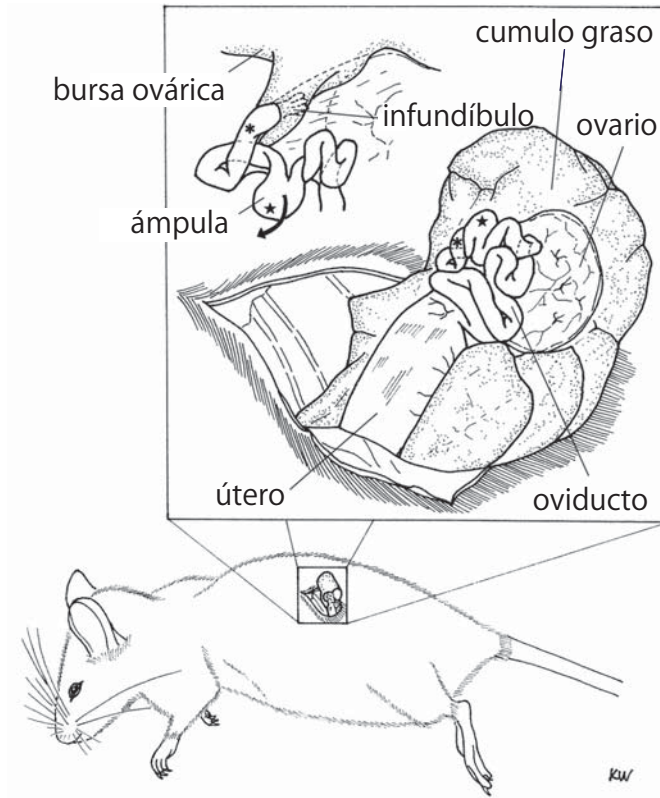


1. Ratón hembra en día 1 de pseudo-preñez (el día en que se observa el tapón vaginal)
2. Anestésico
3. Tijeras de micro-disección con muelle (hoja de 5 mm)
4. Pinzas de relojero #5
5. Pinza Bulldog (serrafine)
6. Grapa de sutura (Autoclip 9mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador de grapas (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
7. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Capilares de vidrio para manipulación y transferencia embrionaria
9. Placa térmica (37°C)

Procedimientos

Preparación del ratón

1. Anestesia un ratón hembra.
2. Extraiga el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino.

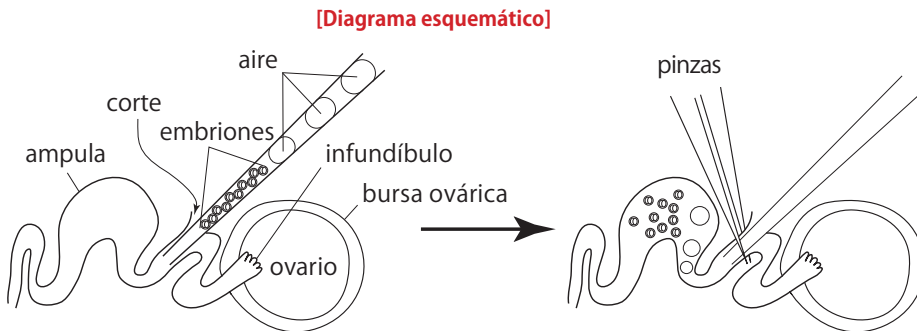


3. Coloque la pinza bulldog en el cúmulo graso adosado a la bursa ovárica.



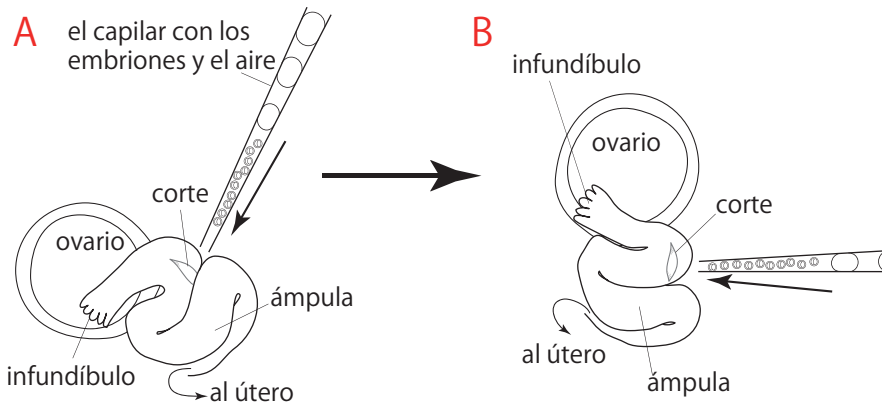
Colocando el oviducto

Como se indica en el diagrama siguiente, la transferencia embrionaria en oviducto se lleva a cabo cortando el oviducto, insertando el capilar dentro y liberando los embriones en dirección a la ampulla.



Desafortunadamente los oviductos del ratón son pequeños y los conductos están plegados de una manera complicada, como se muestra en el diagrama del oviducto exteriorizado esquematizado abajo (A). Esto hace muy difícil introducir el capilar en el oviducto en dirección a la ampulla por que la inserción se hace por arriba.

Para hacer este procedimiento más simple, posicione el oviducto cambiando la posición de la pinza serrafina y del ratón antes de comenzar la operación (B).



1. Observe el oviducto bajo una lupa estereoscópica y confirme la posición del infundíbulo y la ampulla usando la punta de unas pinzas, o cambiando la posición de la pinza serrafina.
2. Posicione el oviducto cambiando la posición de la pinza serrafina y del ratón.

Nota

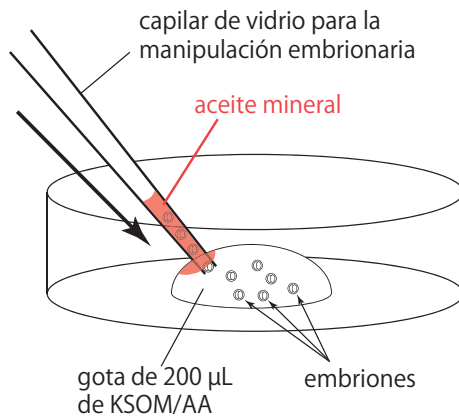
Como los pliegues del oviducto varían entre ratón y ratón, mire detenidamente y ajuste la posición del oviducto para hacer el trabajo más fácil.

Comentario

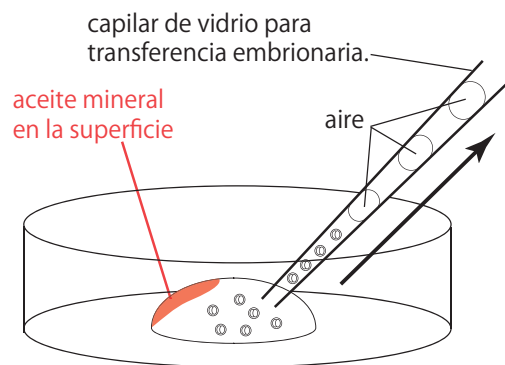
Si usted es zurdo, posicione el oviducto de manera que le sea más fácil realizar el procedimiento con su mano izquierda.

Preparación de los embriones y de los capilares de vidrio

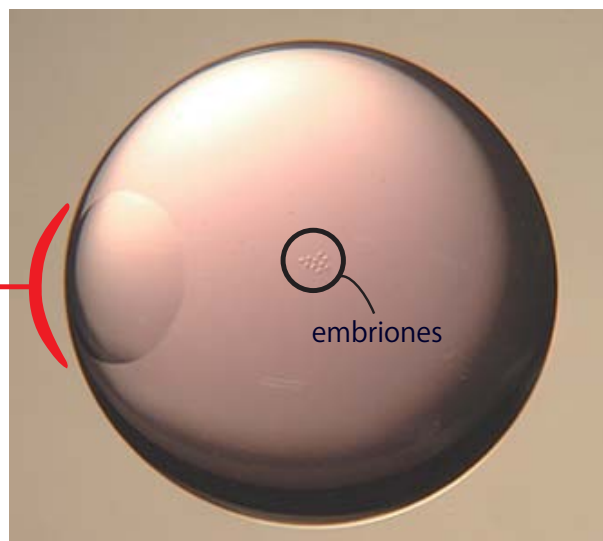
1. Prepare una placa con una gota de 200 μL de KSOM/AA (sin aceite mineral) y ponga 20 embriones en la gota.



2. Para preparar el capilar de vidrio para una transferencia embrionaria aspire aire y medio en intervalos alternados de 2-3 mm cada uno. Coloque diez embriones en el capilar.



aceite mineral en la superficie

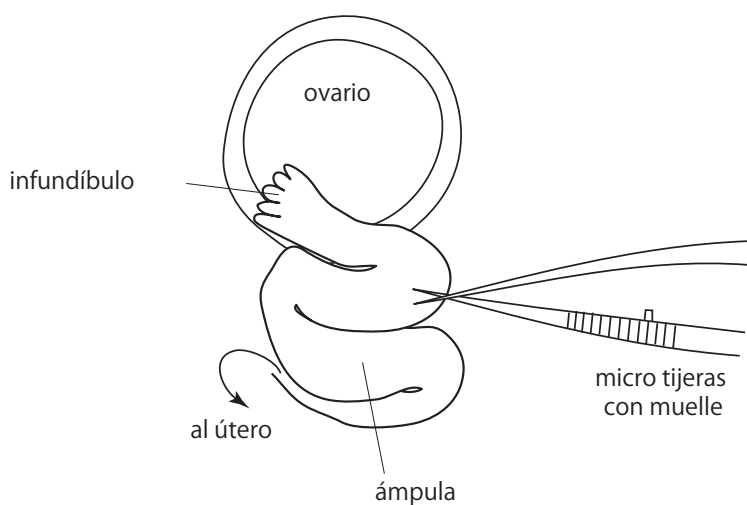


Comentario

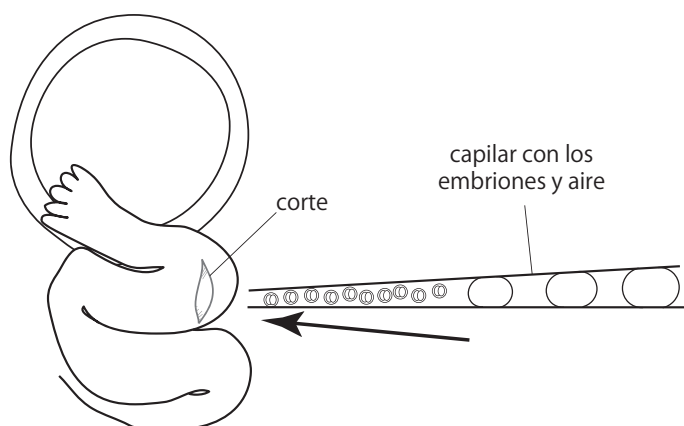
Cuando el capilar de vidrio es introducido en la gota, algo de la aceite mineral quedara en la superficie de la gota tal como se muestra debajo. Los embriones deberán juntarse con la pipeta en el lado opuesto a la mancha en la gota para así evitar aspirar la aceite mineral. Hay evidencias que sugieren que la aceite mineral que pase al oviducto puede provocar efectos adversos en el desarrollo de los embriones a llegar a término.

Transferencia embrionaria

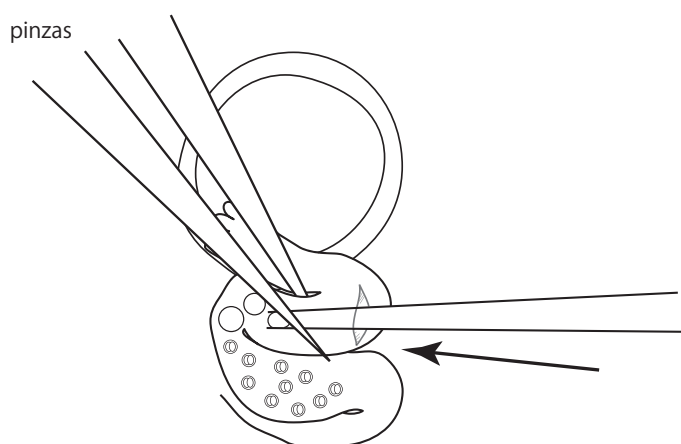
1. Con un par de pinzas de relojero #5 y tijeras de micro-diseccion con muelle diseque la pared del oviducto entre el infundíbulo y la ampúla.



2. Inserte por el corte la punta del capilar que contiene los embriones, luego empuje el capilar dentro del corte hacia la ampúla.



3. Use las pinzas para sostener la parte del oviducto donde se ha insertado el capilar.
4. Libere los embriones y 2-3 gotas de aire dentro de la ampúla.



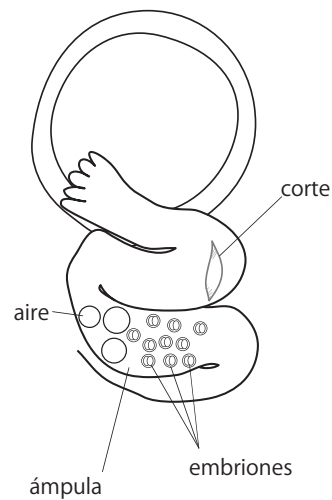
Comentario

Si se ha realizado correctamente, usted podrá observar las burbujas de aire a través de la pared de la ampúla.

Nota

Si usted no puede soltar los embriones y las burbujas de aire en el oviducto, retire un poco el capilar y trate nuevamente.

- Con cuidado retire el capilar del corte.



[Transferencia de embriones en oviducto] No. 17-01



- Empuje el ovario, oviducto y el cuerno uterino hacia dentro del abdomen y cierre la herida usando grapas de sutura.



- Repita el proceso para transferir los 10 embriones restantes en el otro oviducto tal como fue descrito anteriormente.
- Mantenga el ratón sobre una placa térmica a 37°C hasta que se recupere de los efectos de la anestesia.

Referencias

- Nakagata N. 1992. Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice. *Exp. Anim.* 41: 387-388.
- 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.

Nota

Transfiera los embriones luego de ajustar la posición y dirección del oviducto. Si el oviducto está alineado en paralelo al capilar, entonces será más fácil insertarlo dentro del oviducto.

7-3 Transferencia embrionaria en útero

Materiales y equipo

1. Ratón hembra en el 3er día de pseudopreñez (Día 1 es el día en que observo el tapón vaginal)
2. Anestésico
3. Tijeras finas
4. Pinzas de relojero #5
5. Pinza serrafina
6. Aguja 27G
7. Grapa de sutura (Autoclip 9mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador de grapas (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
8. Placas plásticas (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
9. Capilares de vidrio para transferencia embrionaria
10. Placa térmica (37°C)

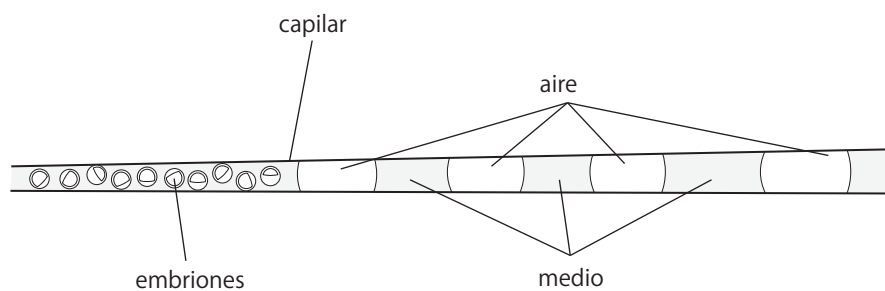
Procedimientos

Transferencia embrionaria

Prepare la receptora, los embriones (en estadio de 8-celulas a blastocisto) y el capilar de vidrio como para el método usado para transferir embriones en oviducto.

(Por favor, consulte al capítulo de transferencia embrionaria en oviducto en la página 67.)

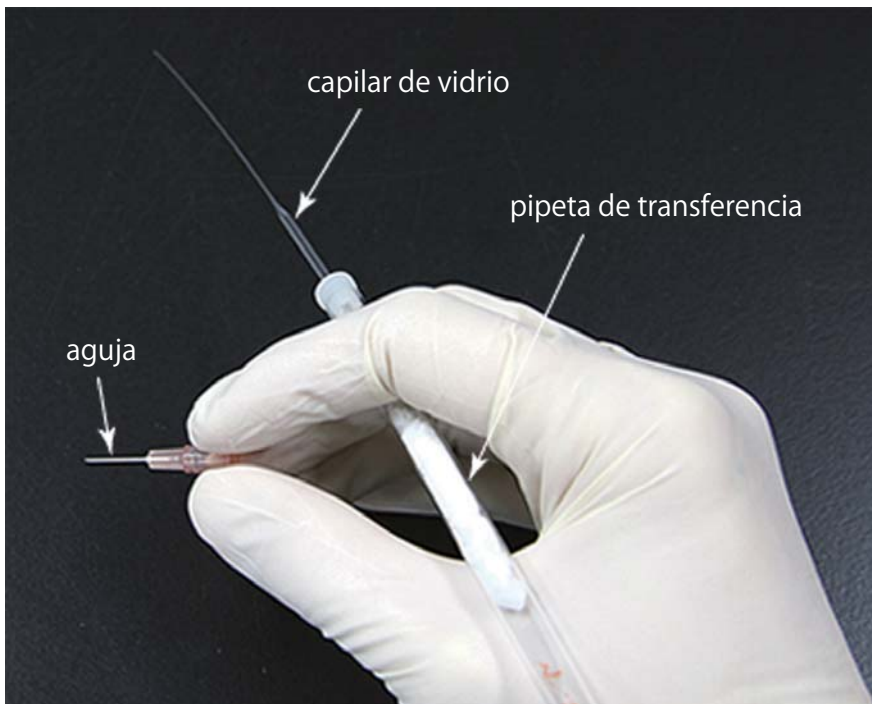
1. Extraiga el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino como en el procedimiento convencional.
2. Fije la pinza serrafina en el cumulo graso que está adosado a la bursa ovárica.
3. En preparación para la transferencia embrionaria, aspire en el capilar de vidrio aire y medio alternados y separados por intervalos de 2-3 mm.



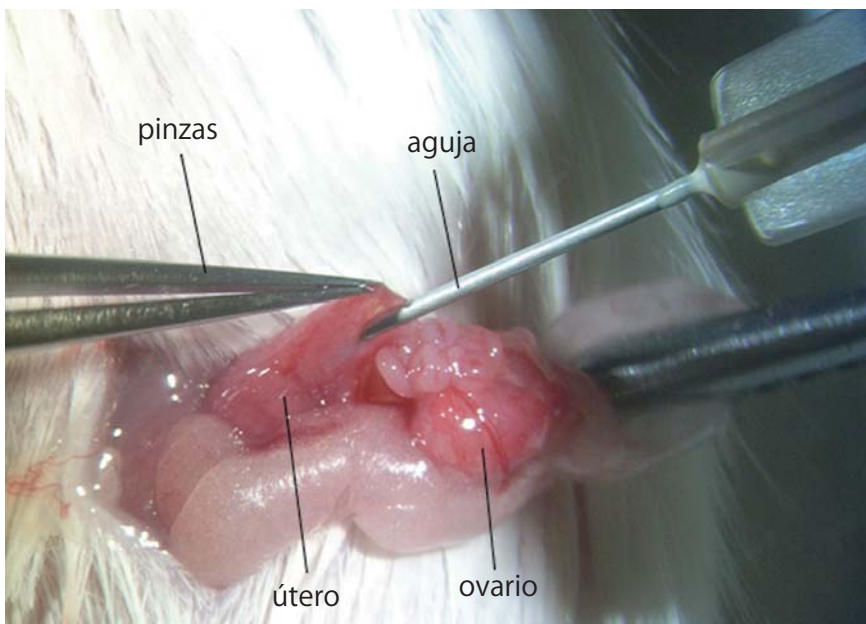
Nota

Cuando prepare el capilar de vidrio, evite dejar el capilar en contacto con el aceite mineral.

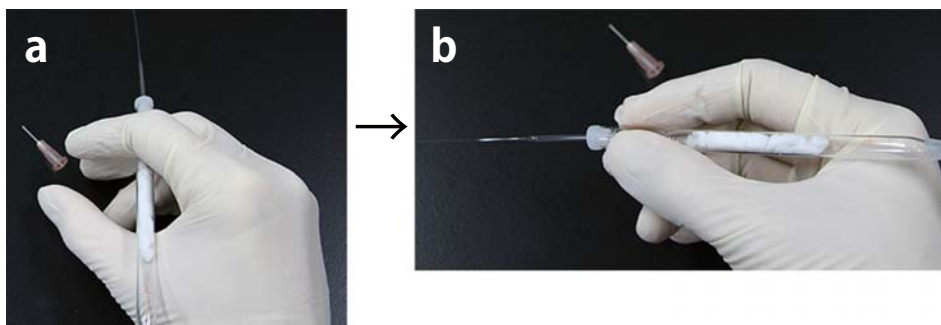
4. Sostenga la aguja de 27G y la pipeta de transferencia como muestra la foto de abajo, simultáneamente observe bajo la lupa estereoscópica ambos, la punta de la aguja y el útero. Asegúrese de mirar a la aguja y el útero simultáneamente bajo la lupa estereoscópica para confirmar la posición de la aguja en relación con el útero.



5. Con cuidado, sostenga la parte superior del cuerno uterino usando unas pinzas finas e inserte la aguja 27G en la pared del útero hacia la cavidad uterina.



6. Deje la aguja y sostenga la pipeta de transferencia como lo muestran los diagrama a y b. Inserte la punta del capilar que contiene los embriones y las burbujas de aire profundamente en la cavidad uterina a través del orificio hecho con la aguja, como muestra el diagrama c.



7. Libere los embriones en la cavidad uterina junto con 2-3 burbujas de aire.
8. Suavemente retire el capilar del orificio.

[Transferencia embrionaria en útero] No. 18-01

[Realizando la operación] No. 18-02

Nota

Usted debe sostener la parte superior del cuerno uterino y seguir observando el orificio hecho con la aguja hasta que la transferencia embrionaria se termine. Si usted aparta la vista del orificio antes de que se complete el procedimiento, puede ser difícil encontrar el nuevamente el sitio del orificio.

Nota

Si usted no puede liberar los embriones y las burbujas de aire en el oviducto, retire un poco el capilar e intente nuevamente.

Nota

Para facilitar mantener la vista en el orificio hecho con la guja usted deberá sostener la aguja y la pipeta de transferencia, ambas en su mano dominante, antes de comenzar el procedimiento.

- Empuje el ovario, oviducto y cuerno uterino dentro del abdomen y cierre la incisión con grapas de sutura.



- Repita el proceso para transferir 10 embriones en el otro cuerno uterino como ha sido descrito anteriormente.
- Mantenga el ratón en una placa térmica a 37°C hasta que se recupere de los efectos de la anestesia.

Referencias

- 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.

7-4 Cesárea y adopción

La cesárea deberá realizarse si la receptora preñada no ha parido las crías para la fecha estimada de parto.

Materiales y equipo

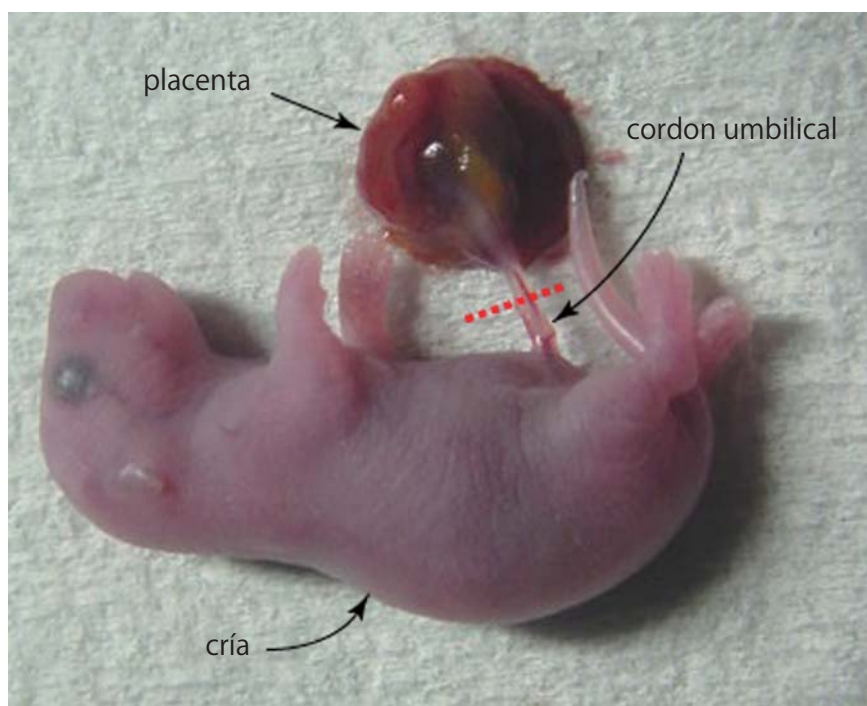
1. Madre nodriza (Una nodriza es una hembra que haya parido el mismo día o el día anterior al día estimado de parto de la hembra preñada.)
2. Tijeras finas
3. Pinzas de relojero #5
4. Placa térmica (37°C)
5. Ratón hembra preñada

Procedimientos

Cesárea

1. Sacrifique la hembra preñada y limpie el abdomen con un algodón embebido en etanol 70%.
2. Abra inmediatamente el abdomen y con una tijeras finas retire el útero con las crías.
3. Coloque el útero sobre un papel absorbente y corte la pared uterina.
4. Rápidamente retire las crías del saco vitelino y del amnios y corte el cordón umbilical.

[Cortando el cordón umbilical]




5. Use pañuelos de papel para limpiar el cuerpo de las crías el fluido amniótico, secreciones y sangre.
6. Coloque las crías sobre una placa térmica a 37°C , suavemente pellizque varias veces la cola de cada una con unas pinzas hasta que comiencen a respirar y se tornen suficientemente rosados.

[Desde la extracción del útero a la primera respiración de las crías] No. 19-01 

Adopción

Seleccione una madre nodriza cuyas crías tengan un color de capa diferente que los nacidos por cesárea, para luego poder distinguir entre ellos.

1. Quite la madre nodriza de la caja.
2. Reduzca el número de crías de la nodriza a la mitad (por ejemplo, si el número de crías de la nodriza es 10, quite 4-5 crías).
3. Frote las crías obtenidas por cesárea y que serán adoptadas (el mismo número de crías que las que se han retirado) con el material de la cama, luego mézclelas con las crías restantes de la nodriza.
4. Ponga la nodriza nuevamente en la caja.

[Adopción] No. 19-02 

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.

8-1 Almacenamiento de medios y soluciones en ampollas bajo gas de nitrógeno

Materiales y equipo

1. Sellador de doble llama (Adelphi Manufacturing, West Sussex, UK)
2. Ampollas (sterilized via hot air sterilization (180°C, 3 horas))
3. Medio
4. Jeringa y aguja 18 G
5. Pinza
6. Gas de nitrógeno

Procedimientos

Limpieza y esterilizado de las ampollas de vidrio

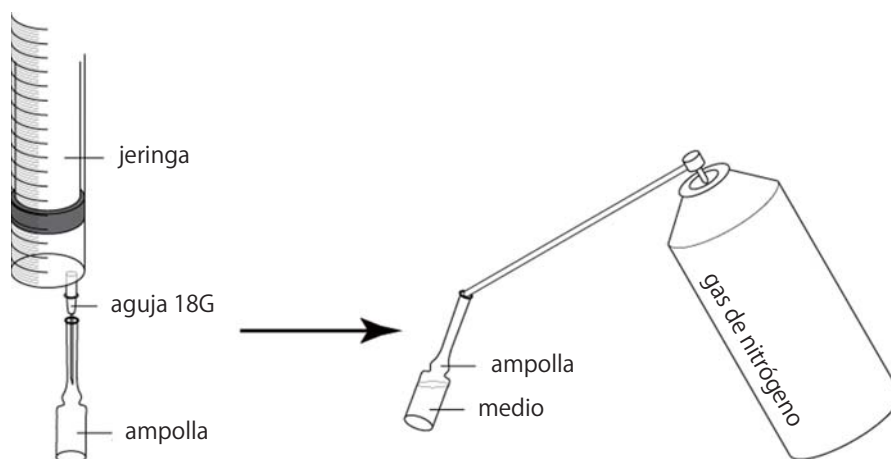
1. Enjuague las ampollas de vidrio solo una vez con agua corriente.
2. Enjuague las ampollas 2 veces con agua destilada.
3. Esterilice las ampollas por calor a 180°C durante 3 horas.

Encendido

1. Abra la llave del gas y encienda el sellador de ampollas de doble boca.
2. Ajuste las llamas del sellador de ampollas para que la llama sea azul.

Sellando las ampollas

1. Agregue la cantidad apropiada de medio a cada ampolla.
2. Introduzca el gas de nitrógeno en la ampolla e inmediatamente selle la punta de la misma usando las llamas del sellador. Repita con todas las ampollas restantes.



[Llenado de ampollas con medio] No. 20-01 

8-2 Tabla de composición de medios

mHTF

Formula del mHTF

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	593.8	Sigma	S 5886
KCl	35.0	Sigma	P 5405
MgSO ₄ • 7H ₂ O	4.9	Sigma	M 2773
KH ₂ PO ₄	5.4	Sigma	P 5655
CaCl ₂	57.0	Sigma	C 5670
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	50.0	Sigma	G 6152
Na-lactate**	0.34 mL	Sigma	L 7900
Na-Pyruvate	3.7	Sigma	P 4562
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA (Albumin, Bovine serum Fraction V Fatty Acid-Free)	400	MERCK/ ALBIOCEM	126575
0.5% phenol red	0.04 mL	Sigma	P 0290

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

**Ensayo; 70%

El mHTF se envasa en ampollas oscuras y almacena a 4°C .

Referencias

1. Kito S., Hayao T., Noguchi-Kawasaki Y., Ohta Y., Hideki U., and Tateno S. 2004. Improved *in vitro* fertilization and development by use of modified human tubal fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp. Med.* 54(5): 564-570.

Hialuronidasa

Composición de la hialuronidasa

Prepare una solución de stock al 1% como se indica abajo. Esterilize por filtración en y guardelo en alicuotas de 100 μL a -20°C . Antes de usar, diluya la solución de stock 10 veces. Ej.: agregue 20 μL de la solución de stock (1%) a la gota de 200 μL de mHTF que contiene los ovocitos para obtener una solución diluida al 0.1%.

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Hialuronidasa	10	Sigma	H 3506

*mg/mL en mHTF

Sacarosa 0.3 M (BSA-)**Composición de la sacarosa 0.3M (BSA -)**

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sacarosa	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20mL en PB1

Composición del PB1 (BSA-)

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.3M (BSA-) se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

0.3 M Sucrose (BSA +)

Composición del 0.3 M sucrose (BSA+)

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sucrose	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL en PB1

Composición del PB1(BSA+)

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.3M (BSA-) se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

KSOM/AA**Composición del KSOM/AA**

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	555.0	Sigma	S 5886
KCl	18.5	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	4.75	Sigma	P 5655
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.95	Sigma	M 2773
CaCl ₂ · 2H ₂ O	25.0	Sigma	C 7902
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	3.6	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.2	Sigma	P 4562
DL-Lactic Acid sodium salt	0.174 mL	Sigma	L 1375
10 mM EDTA	100 µL	Sigma	E 6635
Streptomycin	5.0	Sigma	S 9137
Penicillin	6.3	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.1 mL	Sigma	P 0290
L-Glutamine	14.6	Sigma	G 8540
MEM Essential Amino Acids solution	1.0 mL	GIBCO	11130-051
MEM Non-essential Amino acid solution	0.5 mL	Sigma	M 7145
BSA	100.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

KSOM/AA se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

Referencias

1. Lawitts J. A., and Biggers J. D. 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol.* 225:153-164.

Sacarosa 0.8M

Composición de la sacarosa 0.8M

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sucrose	5476.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL en PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.8M se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

PB1 se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

DMSO 1M**Composición del DMSO1M**

Nombre del compuesto	mL*	Vendedor	Número de catalogo
DMSO	1.56	Sigma	D 2650
PB1	18.44	-	-

*Volumen final: 20mL

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

El DMSO 1M se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

DAP213**Método de preparación del DAP213**

1. Primero se preparan la solución A y la solución B para que estén totalmente disueltas.
2. Se mezclan volúmenes iguales de A y B para obtener el DAP213.

Solución A

Nombre del compuesto	mL*	Vendedor	Número de catalogo
PB1	2.3088	-	-
DMSO	3.1252	Sigma	D 2650
Propylene glycol (PG)	4.556	Sigma	134368

Atención

La solución puede volverse opaca cuando se le agrega el DMSO.

Solution B

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Acetamide (AA)	1181.4	Sigma	A 0500

*mg/10 mL en PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

El DAP213 se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

Sacarosa 0.25M**Composición de la sacarosa 0.25M**

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sucrose	1711.5	Sigma	S 1888

*mg/20 mL en PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.25M se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C.

mWM

Composición del mWM

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	640.0	Sigma	S 5886
KCl	35.6	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	16.2	Sigma	P 5655
MgSO ₄ · 7H ₂ O	29.4	Sigma	M 7774
NaHCO ₃	190.0	Sigma	S 5761
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.5	Sigma	P 4562
Ca-lactate pentahydrate	46.0	Sigma	C 8356
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.2 mL	Sigma	P 0290
20 mM 2-ME	10.0 µL	Sigma	M 7522
100 mM EDTA	50.0 µL	Sigma	E 6635
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

El mWM se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .



Todos los videos de este manual se encuentran en la memoria extraíble USB/DVD. Si tiene alguna pregunta, por favor no dude en contactarnos.

Contacto:

Cosmo Bio Co., Ltd.

International Sales Dept.

Toyo-Ekimae Bldg., 2-20, Toyo 2-Chome, Koto-ku, Tokyo 135-0016, Japan

Tel: +81-3-56329617

Fax: +81-3-56329618

Email: export@cosmobio.co.jp

Web: www.cosmobio.com

FERTIUP®

Crioprotector
Medio de pre-incubación

CARD MEDIUM®

Medio de Fertilización *in vitro* de ratón

Baja FIV? FERTIUP® le permitirá mejorar!!



FERTIUP® MS CPA
KYD-001-EX



FERTIUP® MS PM
KYD-002-EX

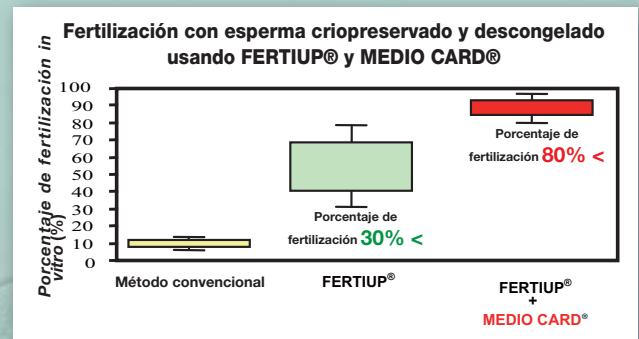


CARD MEDIUM®
KYD-003-EX

FERTIUP® y el MEDIO CARD® son valiosos compuestos para mejorar la recuperación del esperma de ratón congelado y mejorar la eficiencia de la fertilización *in vitro* del ratón de laboratorio.

El uso combinado del crioprotector FERTIUP® y el medio de pre-incubación FERTIUP® junto con el MEDIO CARD® de fertilización de ratón ofrece los siguientes beneficios:

- Porcentajes de fertilización sobre el 80%
- Mejora el manejo de los animales transgénicos
- Reduce el tiempo de expansión de la colonia
- Producción eficiente con líneas difíciles de criar
- Reduce el trabajo, las instalaciones y el costo de manutención



Descripción	Cat. No.	Cantidad
FERTIUP® Crioprotector: CPA	KYD-001-EX	1 mL
	KYD-001-EX-X5	5 x 1 mL
	KYD-001-05-EX	0.5 mL
	KYD-001-05-EX-X5	5 x 0.5 mL
FERTIUP® Medio de pre-incubación: PM	KYD-002-EX	1 mL
	KYD-002-EX-X5	5 x 1 mL
	KYD-002-05-EX	0.5 mL
	KYD-002-05-EX-X5	5 x 0.5 mL
MEDIO CARD® El kit incluye 1 ampolla con medio (A), 1 vial con materia en polvo (B), un tubo plástico de 1.5 mL (c), un tubo plástico de 1.5 mL (D), una jeringa descartable de 2.5 mL, 1 aguja, 1 filtro (tamaño de poro: 0.22 µm)	KYD-003-EX	1 kit
Conjunto FERTIUP® PM 1ML-MEDIO CARD® FERTIUP® Medio de pre-incubación: PM (1 mL) x 1 vial, MEDIO CARD® x 1 Kit	KYD-004-EX	1 juego
Conjunto FERTIUP® PM 0.5ML- MEDIO CARD® FERTIUP® Medio de pre-incubación: PM (5 mL) x 1 vial, MEDIO CARD® x 1 Kit	KYD-005-EX	1 juego

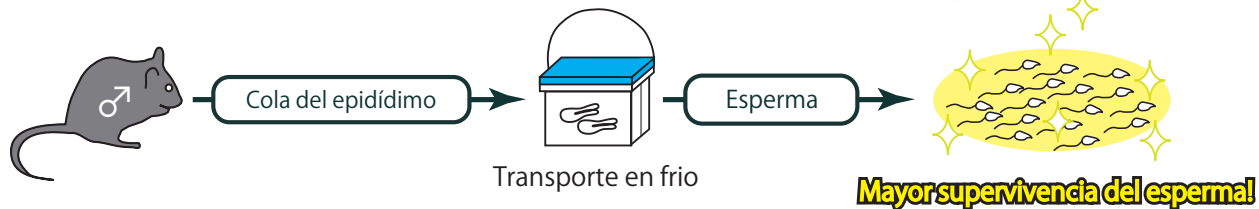
Kit para transporte en frío

Especialmente designado para un transporte económico y seguro de los epidídimos y embriones de ratón a bajas temperaturas.

- Reduce el costo de transporte de ratones vivos
- Elimina el riesgo de fatalidades o escape de los ratones durante el transporte
- Previene la transmisión de patógenos
- Importante para el rescate por el método de fertilización *in vitro* de un stock legado de esperma criopreservado



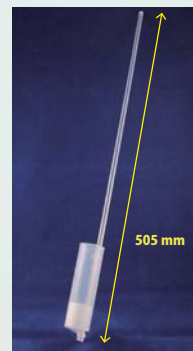
KYD-006-EX



Descripción	Cat. No.	Cantidad
Kit para transporte en frío CARD	KYD-006-EX	1 juego
Caja de transporte de espuma de poliuretano (1 caja), Bolsas refrigerantes (4 grandes, 2 pequeñas), termo (1 botella), caja de papel (1 caja), material protector (1 pieza)		

FERTIUP® & y MEDIO CARD® productos periféricos

Descripción	Cat. No.	Cantidad
Pajuelas de semen (10 piezas x 10 unidades)	KYD-S020X10	10 pza
Canasta de congelación	KYD-S018	1 unidad
Conector de pajuelas (incluye 5 partes)	KYD-S025	1 pza
Casete triangular corto (10 unidades)	KYD-S021	10 unidad
Casete triangular largo (10 unidades)	KYD-S035	10 unidad
Conjunto de instrumentos para manipular embriones	KYD-S036	1 juego
Capilares de vidrio 20 Pzas	KYD-S037	1 juego
Mechero APT-3	PHD-APT3-EX	10 unidad



Canastilla de congelado
KYD-S018



Conector de pajuelas
KYD-S025

Conjunto de instrumentos para la manipulación de embriones
KYD-S036



Casete triangular largo
KYD-S035



Casete triangular corto
KYD-S021



Pajuelas de semen
(10 piezas)
KYD-S020X10



Mechero APT-3
PHD-APT3-EX



COSMO BIO CO., LTD.

Busca!

fertiup



CARD HyperOva[®]

Reactivo para aumentar la superovulación en ratón



Crías nacidas por FIV de una sola hembra superovulada con CARD HyperOva[®]

Excelente para FIV.

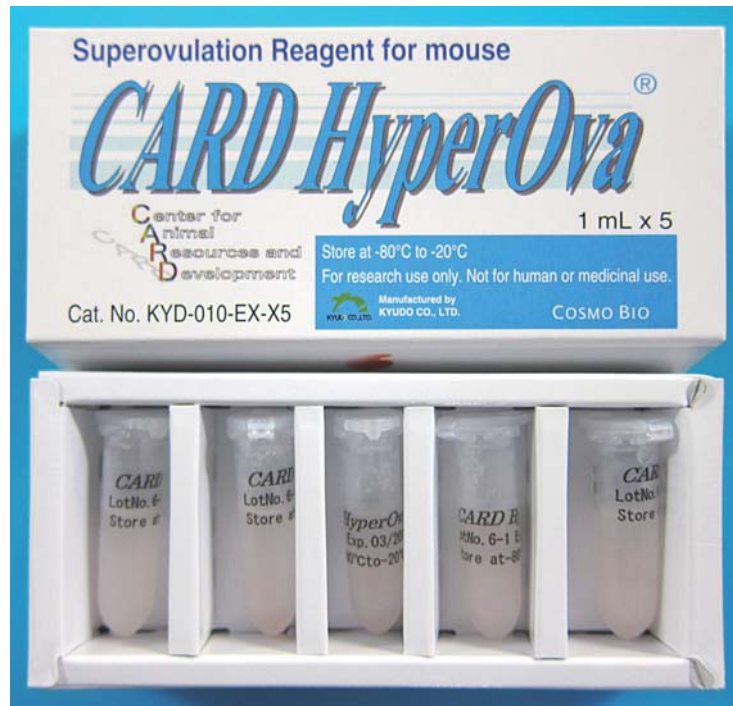
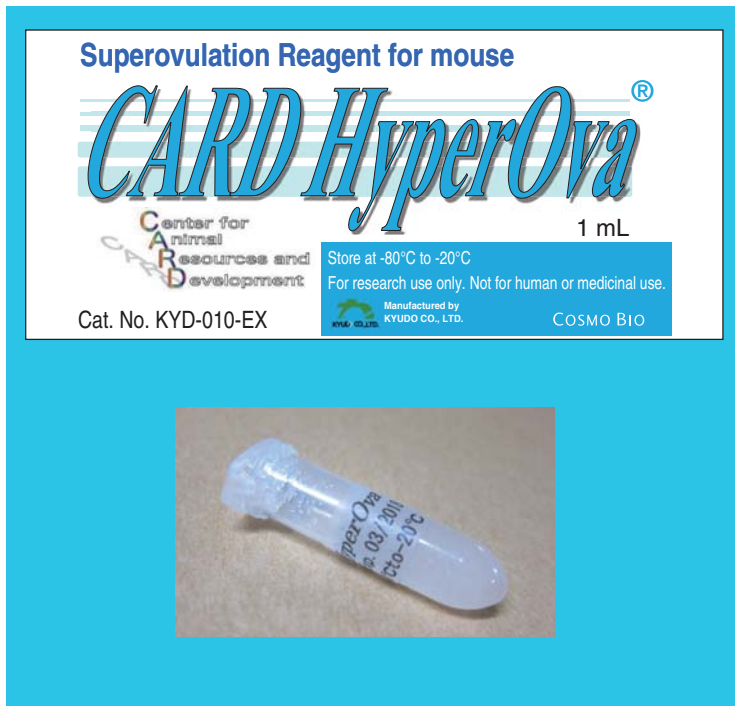
Use HyperOva para obtener más ovocitos ovulados.

- Aproximadamente 100 ovocitos pueden ser recolectados de una sola hembra C57BL/6J
- Maximiza la eficiencia de la FIV usando HyperOva[®] asociada al medio de criopreservación FERTIUP[®], medio de pre-incubación FERTIUP[®] y el medio de fertilización *in vitro* para ratón MEDIO CARD[®].

Center for
Animal
Resources and
Development



COSMO BIO CO., LTD.



Composición:

Una combinación optimizada de anticuerpos anti-inhibina y gonadotropina corionica equina (eCG)

Procedimiento de superovulación:

1. Inyecte 0.1-0.2 mL CARD Hyperova i.p en un ratón hembra de 26 a 30 días de edad. (nacimiento = 0)
2. A las 48 horas más tarde las receptoras del HyperOva® CARD se inyectan con 7.5 UI de gonadotropina corionica humana (hCG) (No se incluye)

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

Descripción	Cat. No.	Cantidad	Almacenamiento
CARD HyperOva®	KYD-010-EX	1 mL	-20°C
	KYD-010-EX-X5	5x1 mL	-20°C

Envío: Nieve carbónica (Hielo seco)

Líquidos y medios para Vitricificación/ descongelado/ Para la manipulación de embriones de rata y ratón

Para ratón

Descripción	Aplicación	Cat. No.	Cantidad	Almacenaje
HTF	Fertilización <i>in vitro</i>	CSR-R-B070	10 x 2 mL	4°C
HTF	Fertilización <i>in vitro</i>	CSR-R-B071	10 x 5 mL	4°C
mHTF	Fertilización <i>in vitro</i>	KYD-008-02-EX	1 x 2 mL	4°C
mHTF	Fertilización <i>in vitro</i>	KYD-008-02-EX-X5	5 x 2 mL	4°C
mHTF	Fertilización <i>in vitro</i>	KYD-008-05-EX	1 x 5 mL	4°C
mHTF	Fertilización <i>in vitro</i>	KYD-008-05-EX-X3	3 x 5 mL	4°C
KSOM	Cultivo <i>in vitro</i>	CSR-R-B074	10 x 2 mL	4°C
KSOM	Cultivo <i>in vitro</i>	CSR-R-B075	10 x 5 mL	4°C
mWM	Cultivo <i>in vitro</i>	CSR-R-B081	10 x 5 mL	4°C
0.25M sucrose	Congelado- descongelado	CSR-R-Y077	10 x 2 mL	4°C
0.25M sucrose	Congelado- descongelado	CSR-R-Y078	10 x 5 mL	4°C
1M DMSO	Criopreservación	CSR-R-T072	10 x 2 mL	4°C
DAP213	Criopreservación	CSR-R-T073	10 x 1 mL	4°C

Para rata

Descripción	Aplicación	Cat. No.	Cantidad	Almacenaje
mR1ECM	Cultivo <i>in vitro</i>	CSR-R-M174	10 x 5 mL	4°C
mR1ECM	Cultivo <i>in vitro</i>	CSR-R-M191	10 x 2 mL	4°C

Para manipulación del embrión

Descripción	Aplicación	Cat. No.	Cantidad	Almacenaje
M2	Manipulación <i>in vitro</i>	CSR-R-M083	10 x 2 mL	4°C
M2	Manipulación <i>in vitro</i>	CSR-R-M084	10 x 5 mL	4°C
PB1	Manipulación <i>in vitro</i>	CSR-R-P183	10 x 5 mL	4°C
PB1	Manipulación <i>in vitro</i>	CSR-R-P185	10 x 2 mL	4°C
P10	Criopreservación	CSR-R-P186	10 x 2 mL	4°C
PEPeS	Criopreservación	CSR-R-P187	10 x 1 mL	4°C

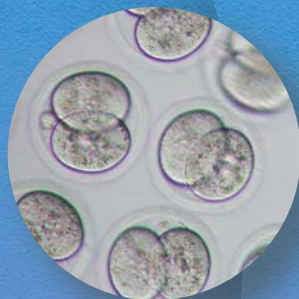


Técnicas de Ingeniería Reproductiva del Ratón Manual Técnico

Naomi Nakagata

División de Ingeniería Reproductiva
Centro de Recursos Animales y Desarrollo (CARD)
Universidad de Kumamoto, Japón

Traducción por
Jorge Sztein



COSMO BIO Co., LTD.

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU, TOKYO 135-0016, JAPAN
TEL : (81)3-5632-9617
FAX : (81)3-5632-9618
e-mail : export@cosmobio.co.jp
URL : www.cosmobio.com

