

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 Vitricación simple de embriones de ratón 54
- 6-2 Vitricación simple de ovocitos de ratón 59
- 6-3 Vitricación 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.

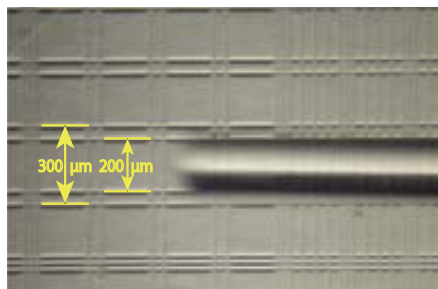
Elaboración de pipetas para la manipulación del embrión

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.

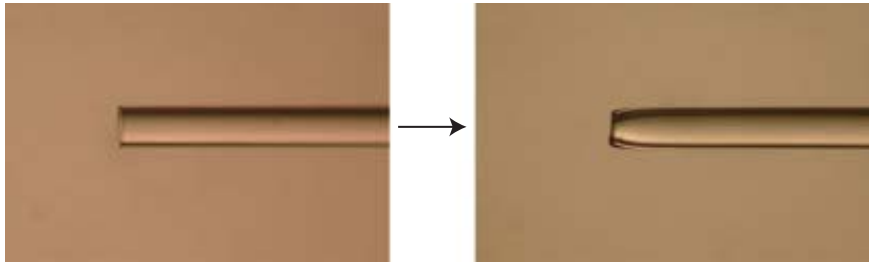
Con práctica, se dominará la técnica y podrá convertir los capilares en pipetas de las dimensiones requeridas

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]



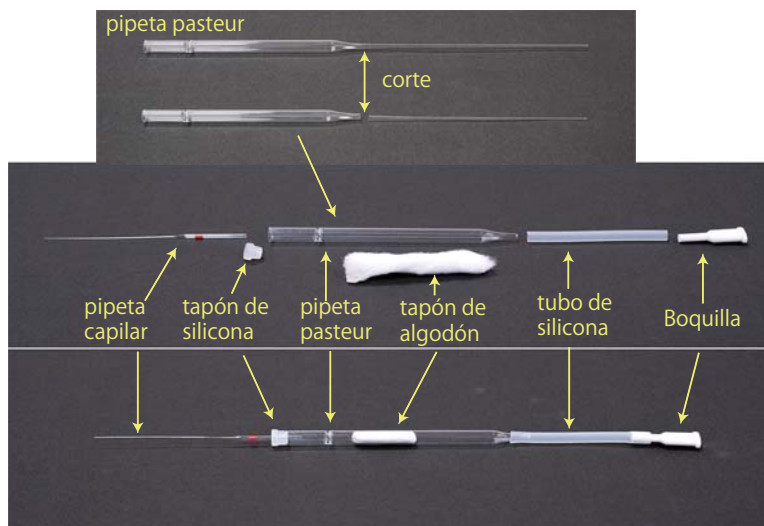
[Pulido de la punta de la Pipeta de vidrio] No. 01-02



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)

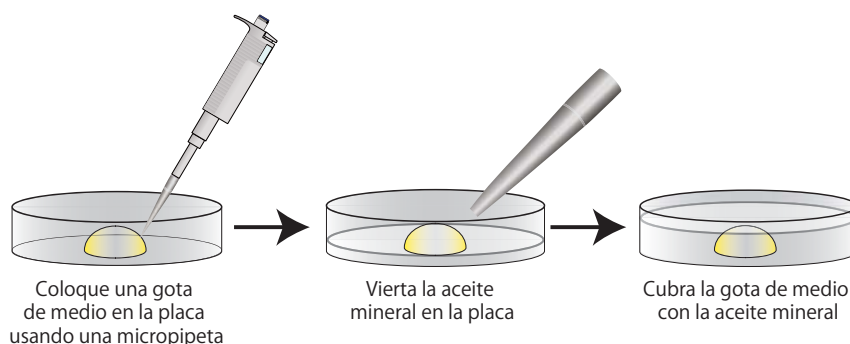
Procedimientos

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).

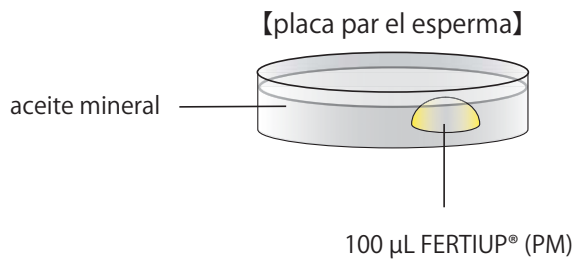
Preparación de las placas

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.



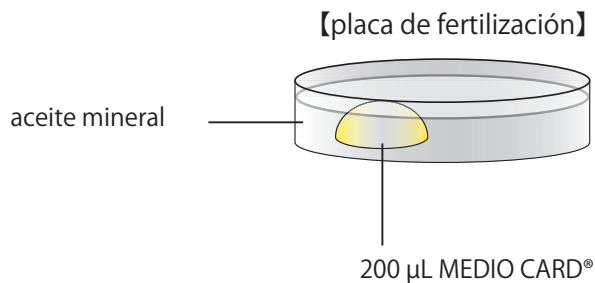
a. Placa de esperma

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.



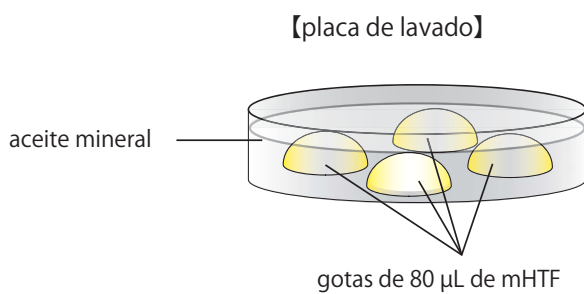
b. Placa de fertilización

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.

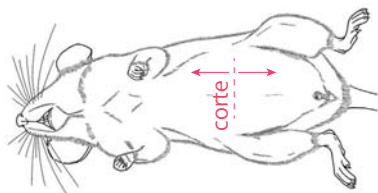
**Nota**

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.

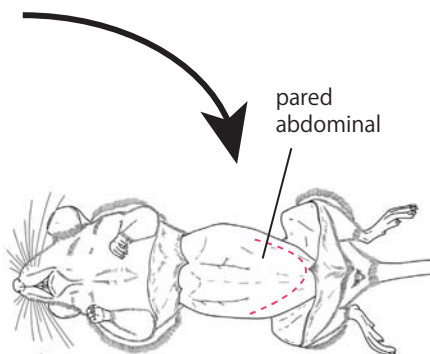
Por favor consulte las instrucciones del MEDIO CARD®.

Recolección de esperma

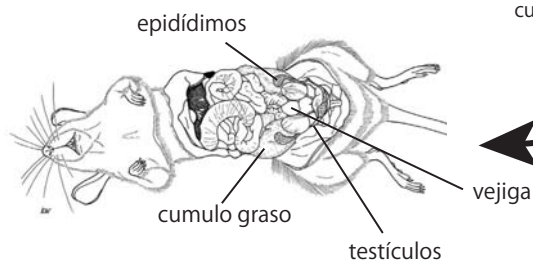
1. Sacrifique 1 or 2 ratones machos adultos (de 3 a 6 meses) y saque las colas de los epidídimos evitando al máximo posible la grasa, sangre y fluidos.
2. Coloque el organo sobre un papel filtro estéril para absorber toda sangre o fluidos.



- 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.



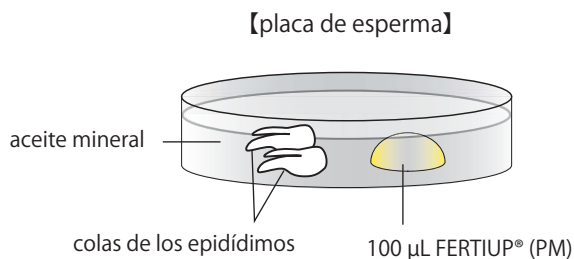
- Disecione la pared abdominal, teniendo cuidado de no dañar los órganos internos.



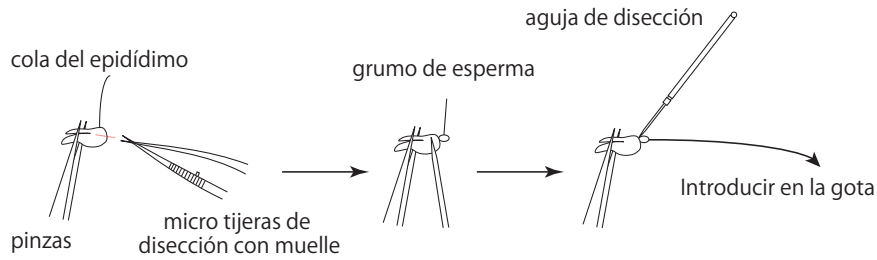
[Extrayendo las colas de los epidídimos] No. 02-01



3. Coloque las colas de los epidídimos en la paca de esperma 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 esperma.
5. Use la aguja de disección para introducir los grumos de esperma liberados del epidídimo en la gota de FERTIUP® (PM).

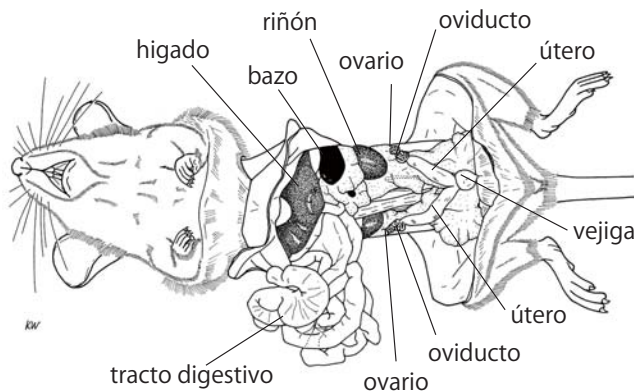


[Recolección de espermia] No. 02-02 

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

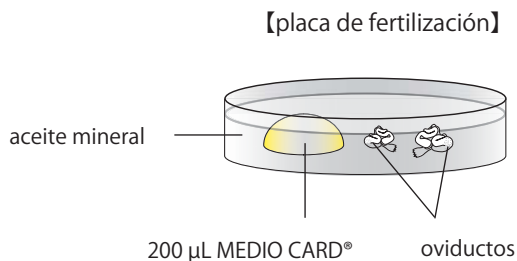
Recolección de ovocitos

- 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

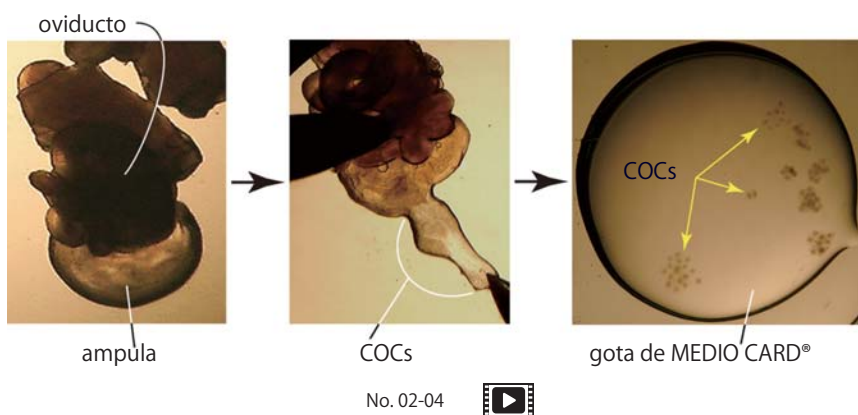
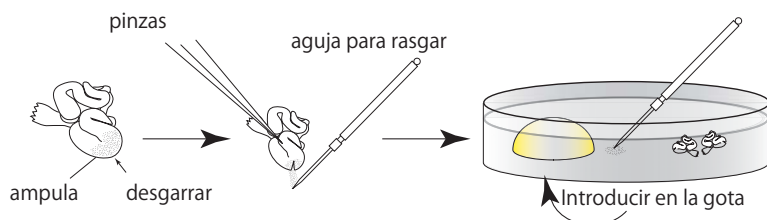
El grado de fertilidad variara en gran medida dependiendo del espermia utilizado.

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

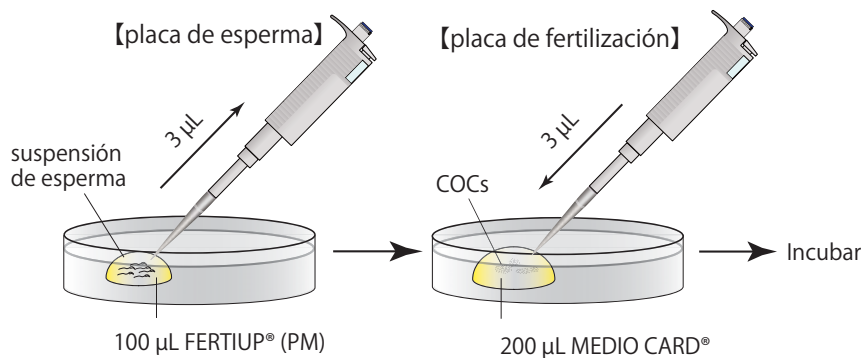
Asegúrese de llevar a cabo todas las operaciones desde el sacrificio de la hembra y la obtención sus oviductos hasta la introducción los COCs en la gota de MEDIO CARD®, en el menor tiempo posible (unos 30 segundos).

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

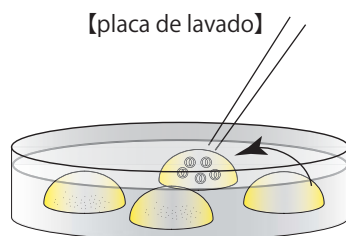


- Seis horas después de la inseminación, observe los ovocitos en la tercer gota de mHTF y elimine todos los ovocitos partenogénicos que tengan solo un pronúcleo.

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



- 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