

# 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-superovulación .....12

## 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.

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

### Materiales y equipo

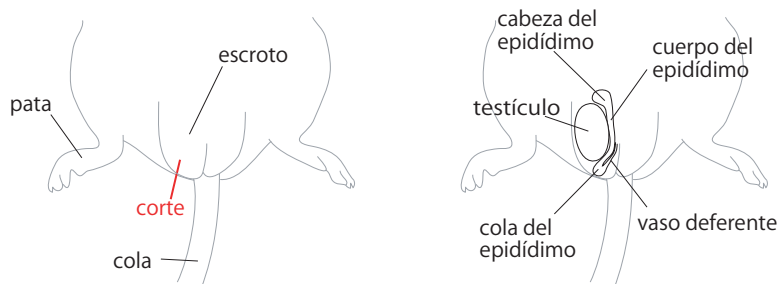
1. Ratón macho (más de 12 semanas de edad)
2. Anestésico
3. Placa térmica (37°C)
4. Tijeras de disección
5. Pinzas de relojero #5
6. Grapas quirúrgicas (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) y aplicador de grapas (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Registro de temperatura (Thermochron iButton 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.

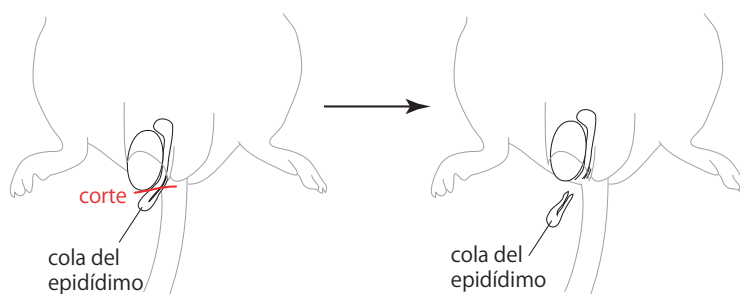
### Procedimientos

#### 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**

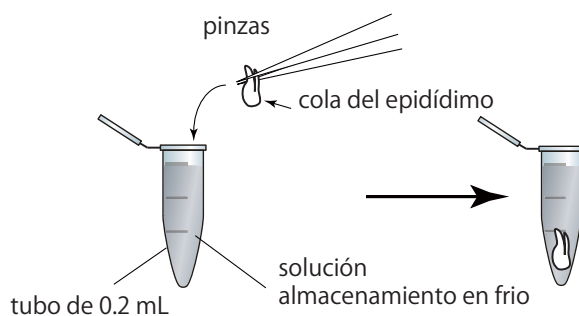
Una semana después de la operación el macho ya puede ser apareado.

**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**

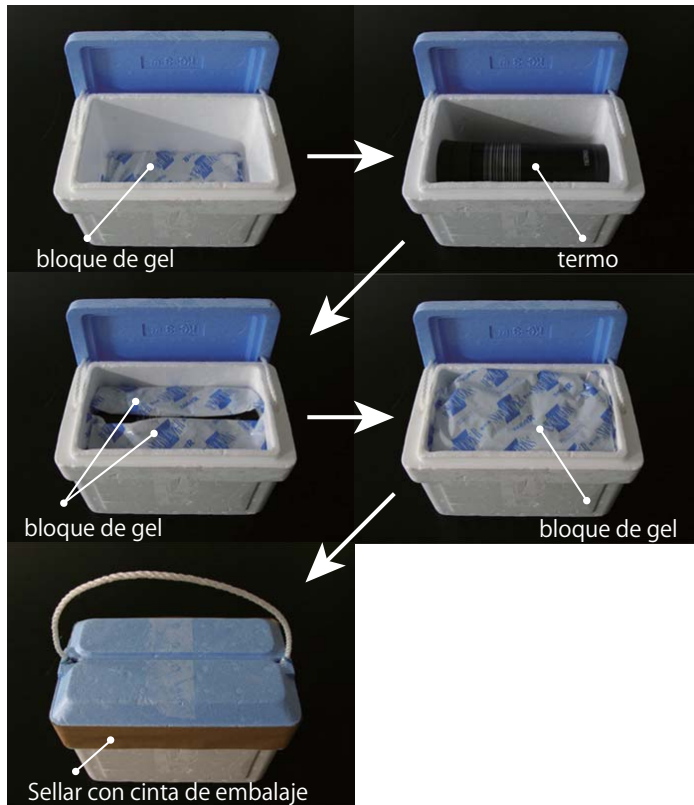
Tenga cuidado de colocar la caja de cartón con la tapa hacia arriba.

**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

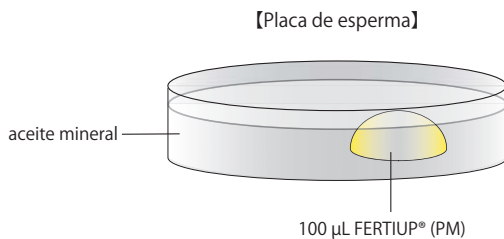
### Materiales y equipo

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% CO<sub>2</sub> 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).

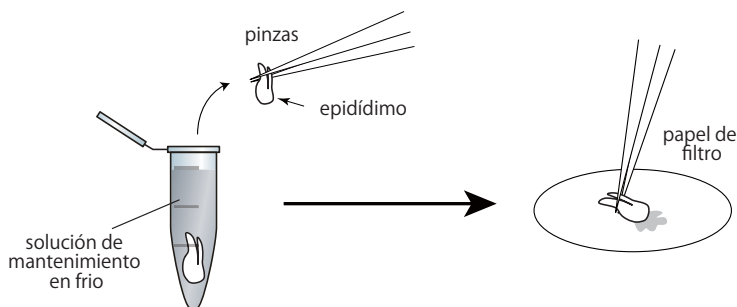


2. Saque el tubo de 0.2 mL con la muestra de la caja de transporte.

**[Retirando la muestra]** No. 04-01

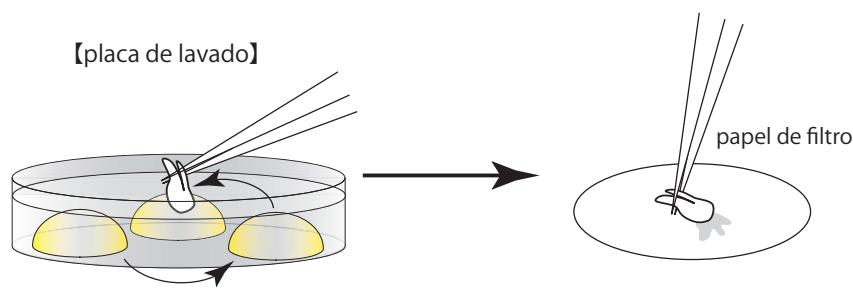


3. Abra el tubo, saque el epidídimo y seque todo rastro de la solución de transporte usando un filtro de papel.





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  $\mu\text{L}$  / 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 de si la fertilización *in vitro* se hará con espermia fresco, congelado o enfriado.

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