

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 esperma 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.

3-1 Criopreservación de Esperma de ratón

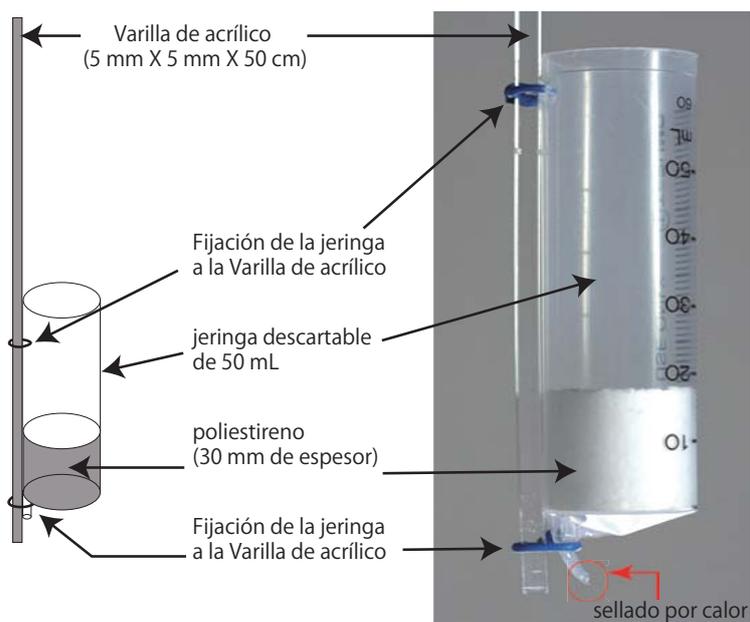
Materiales y equipo

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

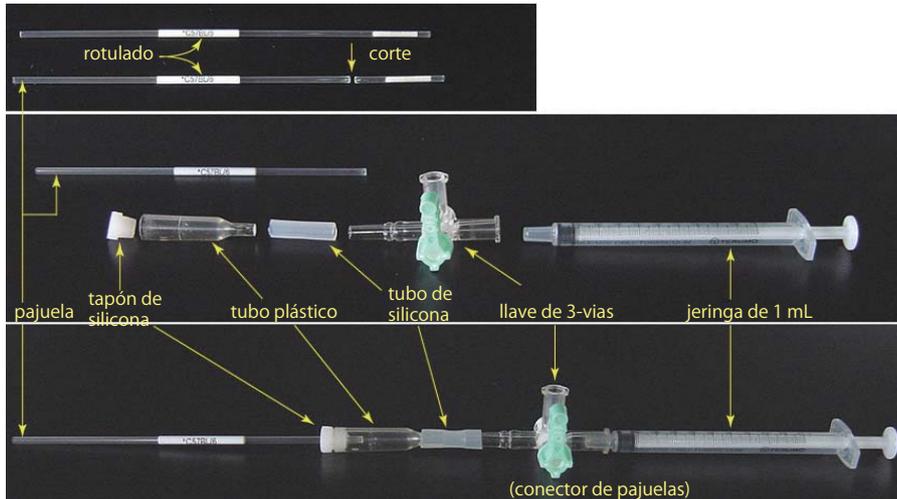
1. Inserte un trozo bien ajustado de poliestireno en el fondo de la jeringa.
2. Selle con calor el pico de la jeringa.
3. Fije la jeringa a la varilla de acrílico.



Preparación del conector de pajuelas

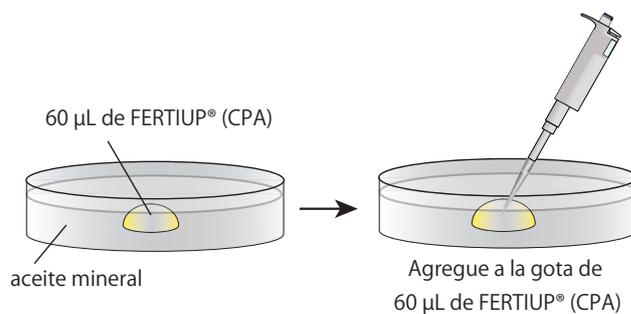
1. Haga un conector de pajuela como lo muestra el diagrama de abajo usando una jeringa de 1 mL, una llave de 3-vías, un trozo de tubo de silicona, un tubo plástico y un tapón de silicona.
2. Para usar el conector de pajuelas, corte el tapón de algodón de la pajuela, después conecte la pajuela a través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

[Conexión de la pajuela al conector]

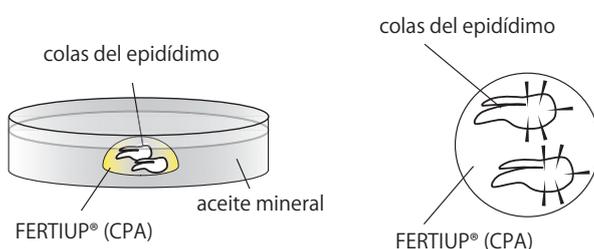


Preparación de la suspensión de espermatozoides

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.



- 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).

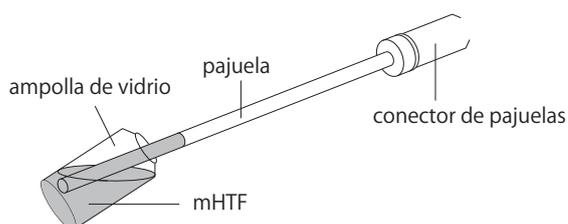
[Cortando el epidídimo y preparando la suspensión de espermatozoides] No.05-01



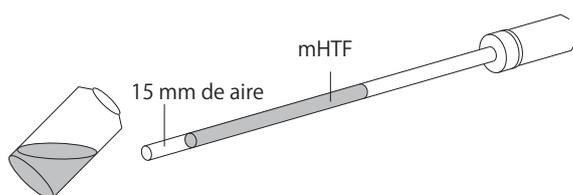
Preparación de la pajuela con la suspensión de espermatozoides

- Ponga una pajuela en el conector de pajuelas.
- Con cuidado aspire las soluciones en la pajuela en el siguiente orden:
 - 100 μ L de mHTF,
 - 15 mm de aire,
 - 10 μ L de la suspensión de espermatozoides,
 - otra columna de 15 mm de aire.

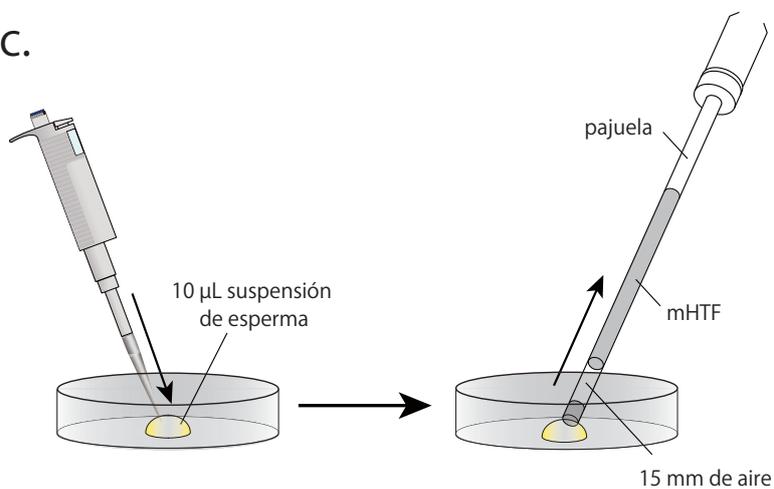
a.



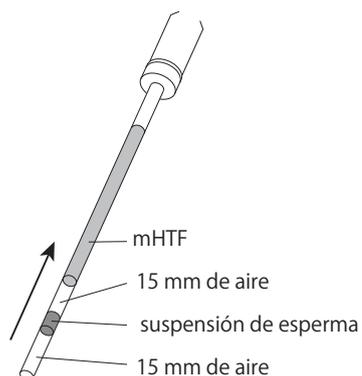
b.



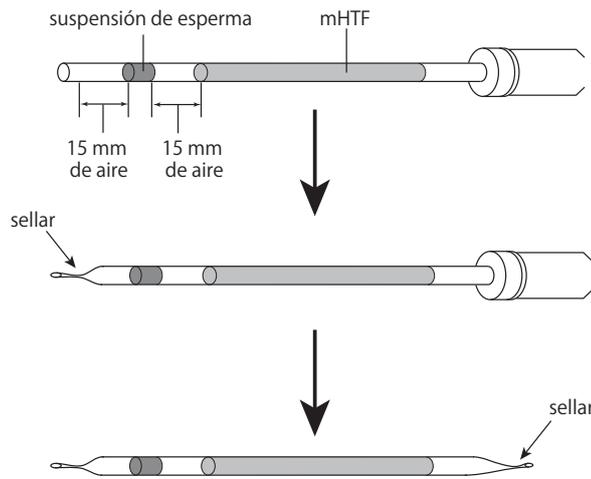
c.



d.



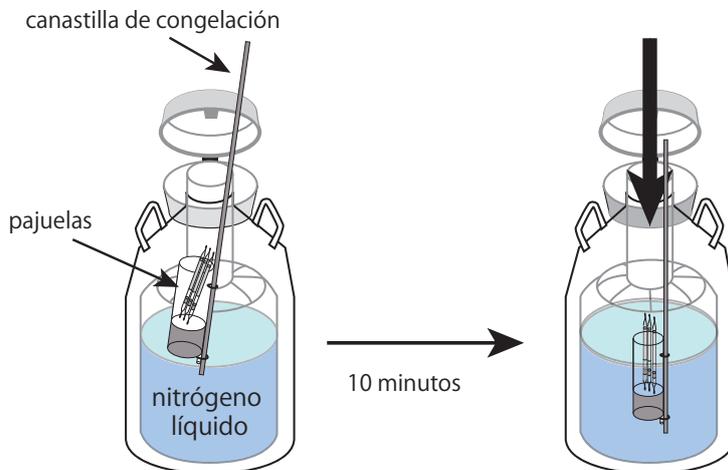
- Selle los dos extremos de la pajuela usando un sellador de impulso.



- 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



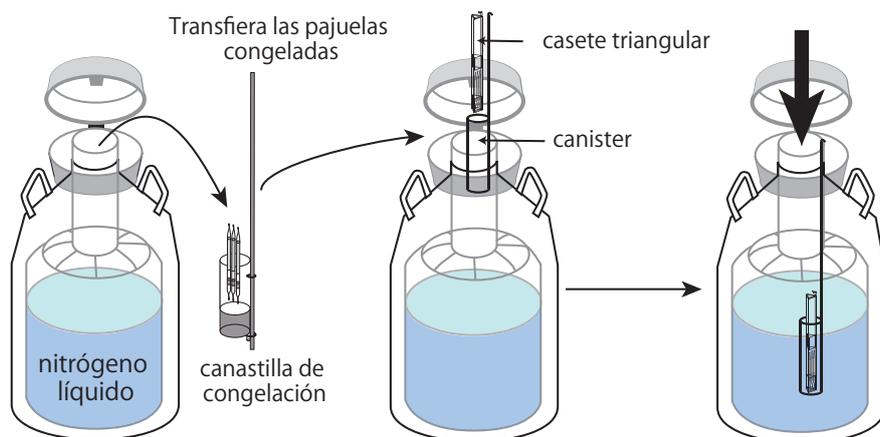
[Congelación de pajuelas] No. 05-02



Comentario

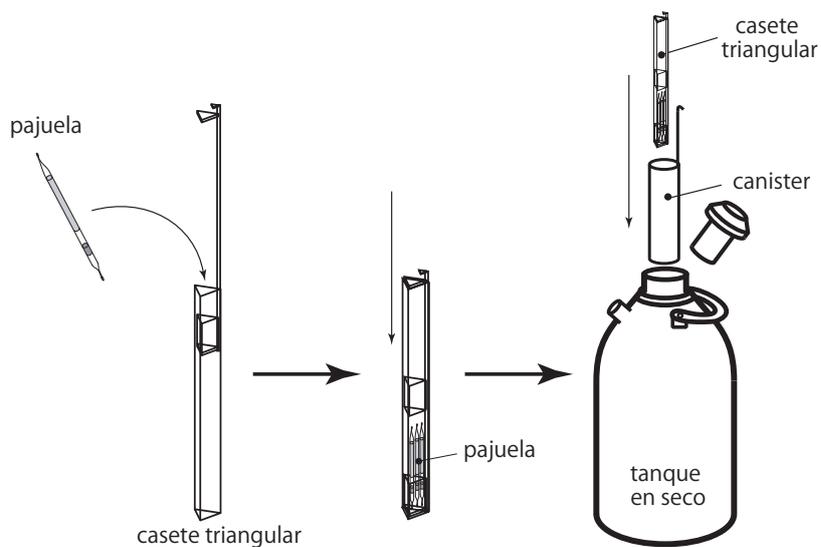
Cargando la pajuela con 100 μL de mHTF previene que esta flote en la superficie del nitrógeno líquido. Esto sucede por que el mHTF hace de contrapeso que fuerza a la pajuela a hundirse en el nitrógeno líquido.

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 esperma 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 esperma usando un tanque de transporte en seco puede ser utilizada para el envío de esperma criopreservado.

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 esperma criopreservado

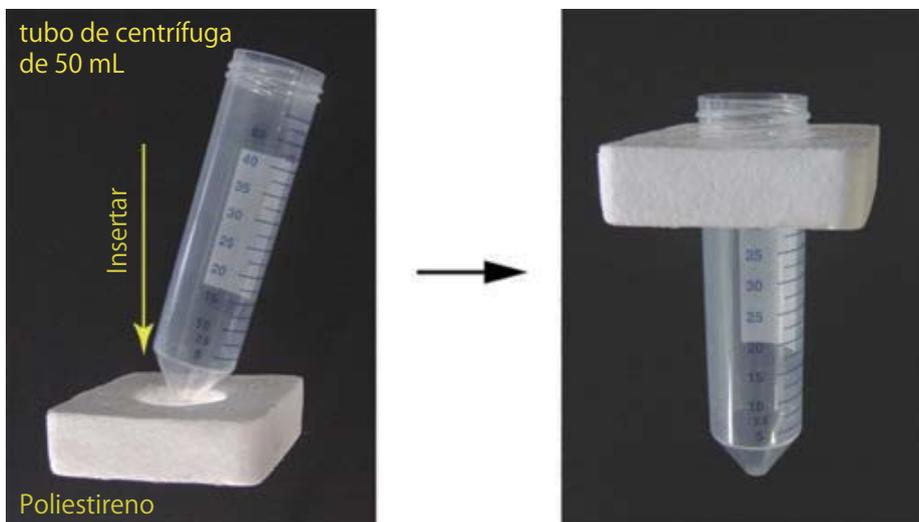
Materiales y equipo

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 esperma 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

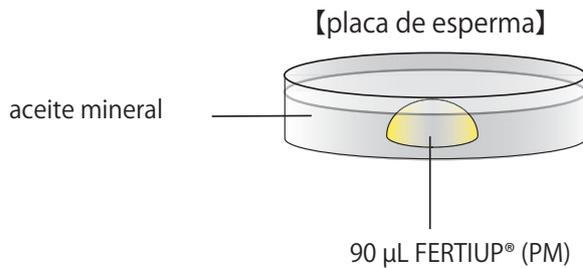
Preparación del flotador para el descongelado

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

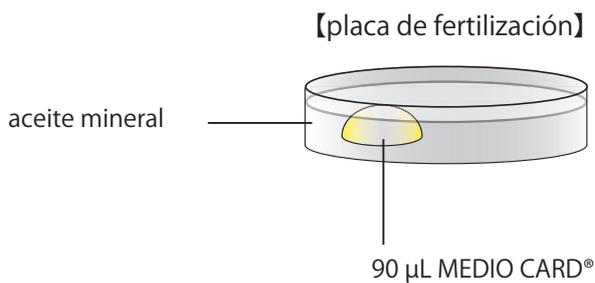


Preparación para el descongelado

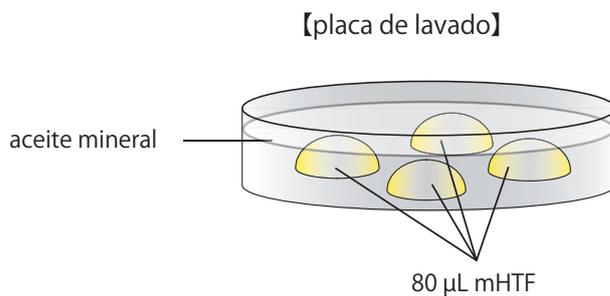
1. Prepare el baño de agua a 37°C .
2. Llene de agua (37°C) el tubo de centrifuga de 50 mL insertado en el poliestireno, y déjelo flotar en el baño de agua.
3. Treinta minutos antes de descongelar la pajuela prepare una placa con 1 gota (90 µL / gota) de FERTIUP®(PM) y cúbrala con aceite mineral; coloque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



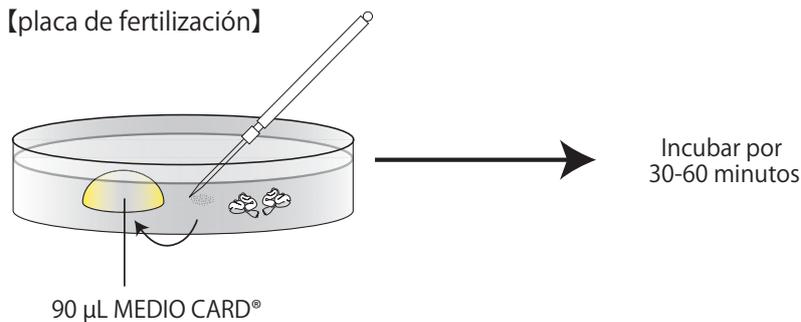
Nota

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.



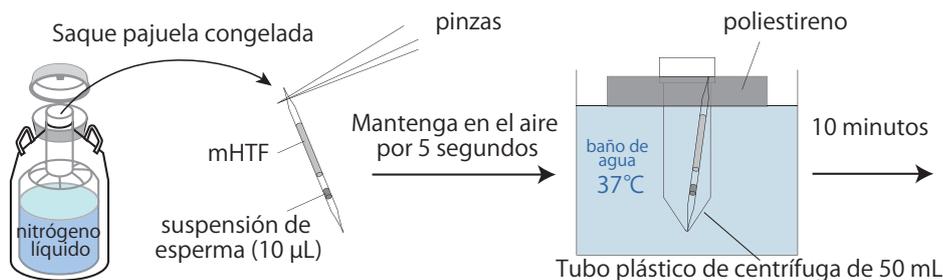
Nota

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.



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

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.

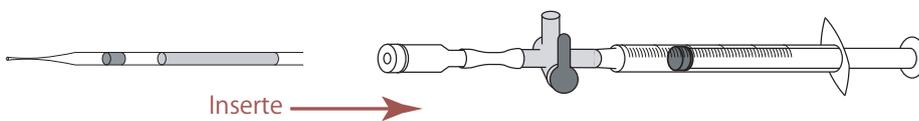
Si la pajuela no es mantenida en el baño de agua el tiempo suficiente (10 minutos), la motilidad del espermatozoides criopreservado se verá reducido.

Transferencia y pre-incubación de la muestra de espermatozoides descongelado

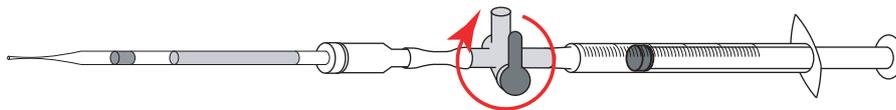
1. Tire el embolo de la jeringa del conector hacia atrás, y corte la pajuela entre las columnas del mHTF y el extremo sellado.



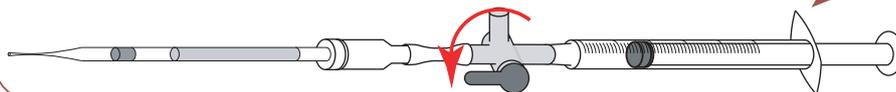
2. Inserte la pajuela cortada en el conector.



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



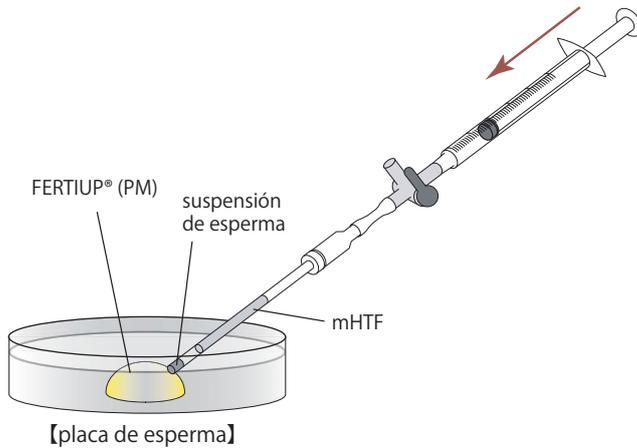
Si se ha olvidado de tirar del embolo de la jeringa, puede hacerlo ahora girando la llave hacia la izquierda.



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

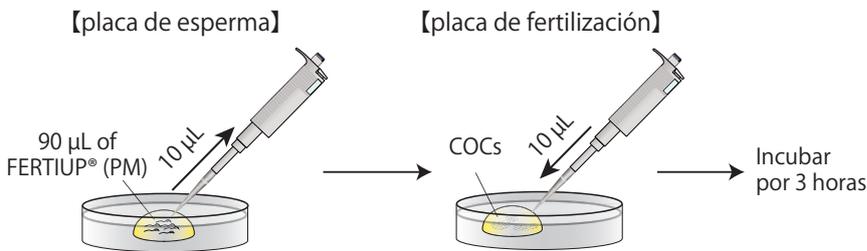


[Transferencia de la suspensión de espermatozoides descongelado] No. 06-02

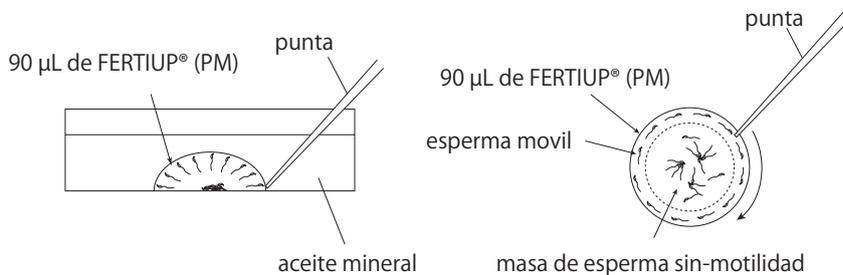


Inseminación

- 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

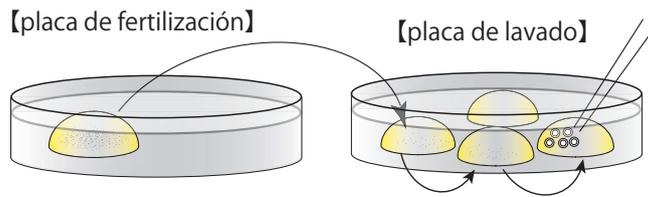
Los espermatozoides con alta motilidad tienden a estar cerca del borde de la gota.

Comentario

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

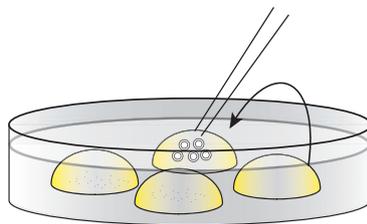
Nota

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., 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.

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

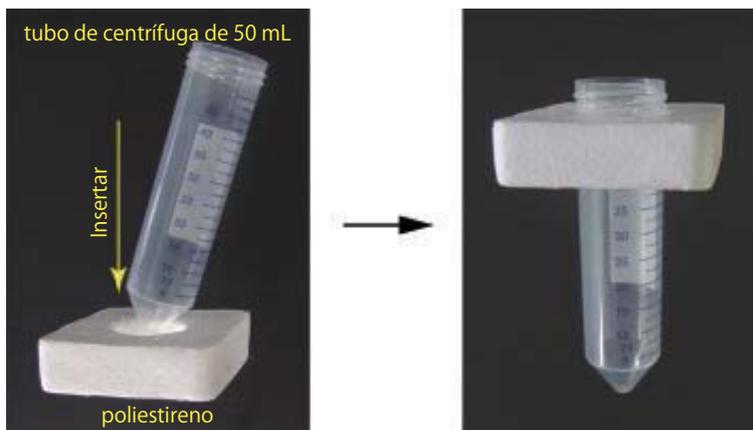
Materiales y equipo

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

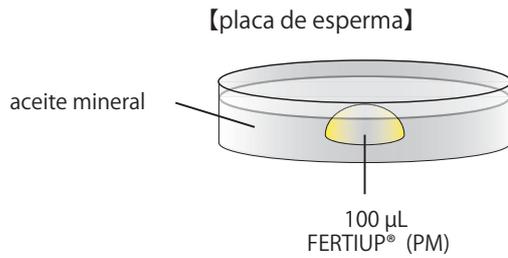
Preparación del flotador para el descongelado

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

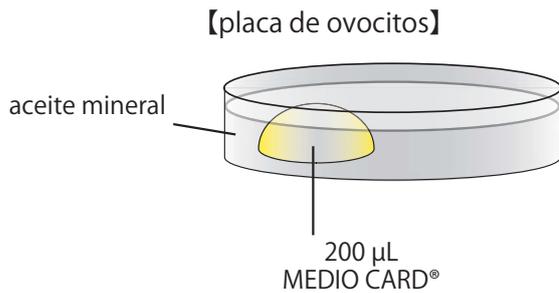


Preparación para el descongelado

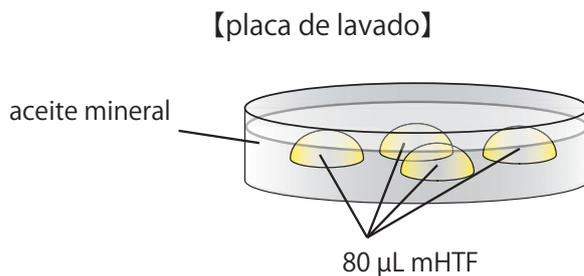
1. Prepare el baño de agua a 37°C.
2. Ponga agua (37°C) dentro del tubo de centrifuga de 50 mL del conjunto poliestireno/tubo de centrifuga que flota en el baño de agua.
3. Treinta minutos antes de descongelar la muestra de espermatozoides, ponga una gota (100 µL/gota) de FERTIUP® (PM) en una placa de 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).

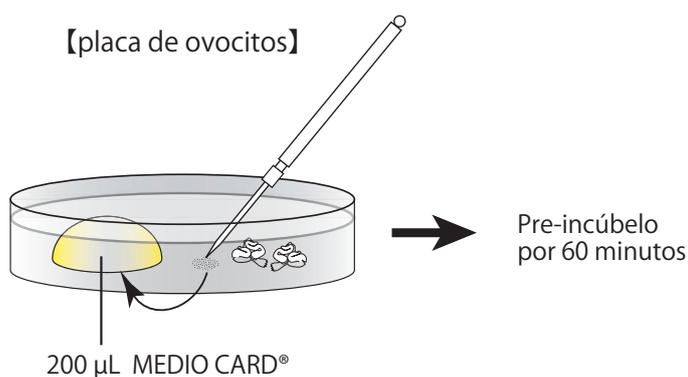


5. Ponga 4 gotas (80 µL / gota) de mHTF en una placa y cúbrala con aceite mineral. Coloque la placa en el incubador (37°C, 5% CO₂ en aire) al menos por 30 minutos.



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®

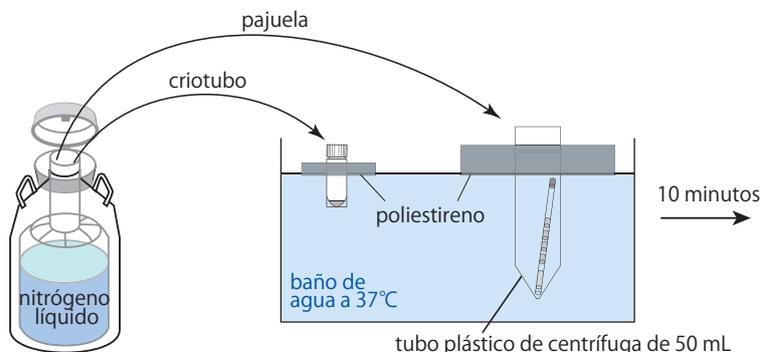
Nota

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).

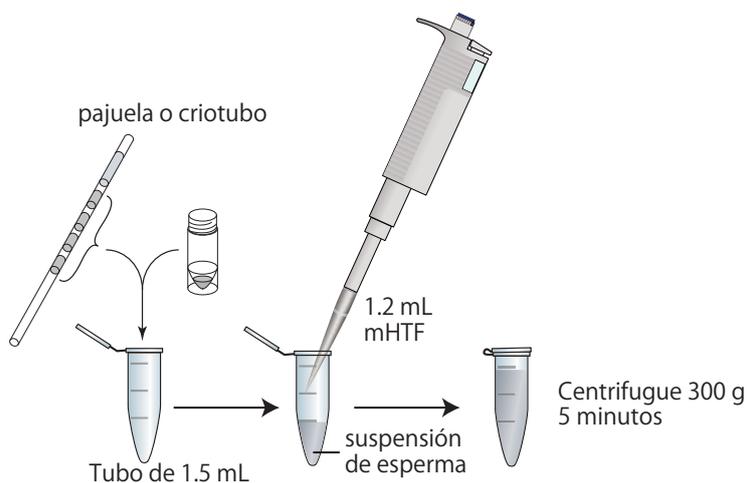
Es más, cuando este trabajo lo haga solo, no sacrifique muchos ratones a la vez, es preferible, sacrificar un ratón y rápidamente obtener sus oviductos antes de continuar con el próximo.

Descongelación del espermatozoides de ratón

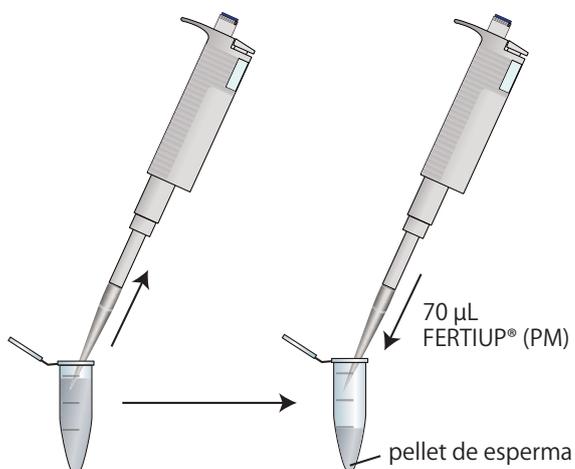
1. Extraiga una muestra de espermatozoides del nitrógeno líquido. Si la muestra fue archivada en un criotubo, abra el tapón y descarte el nitrógeno líquido que exista dentro del tubo. Sumerja la muestra en un baño de agua mantenida a 37°C (utilizando el poliestireno o el ensamblado de poliestireno/tubo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



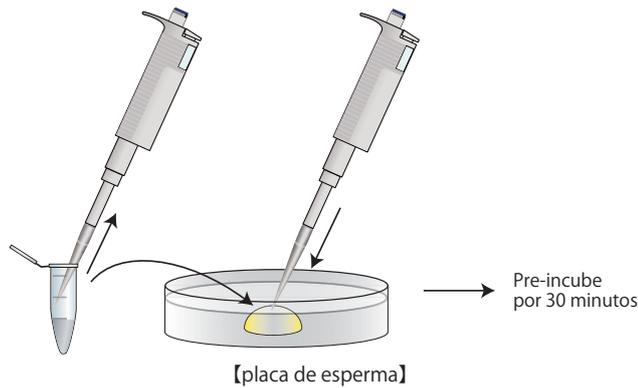
2. Transfiera la suspensión de espermatozoides del criotubo o pajuela a un tubo de 1.5 mL. Lentamente adicione al tubo 1.2 mL de mHTF equilibrado a 37°C, centrifugue a 300 g a temperatura ambiente durante 5 minutos.



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).

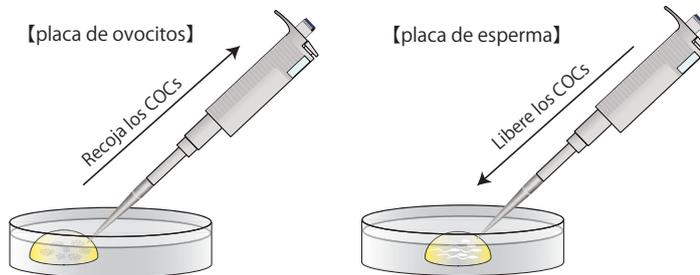


4. Luego de pipetear en forma suave, transfiera todo el contenido del tubo a la gota de FERTIUP® (PM) (placa de espermatozoides). Coloque la placa en el incubador (37°C, 5% CO₂ en aire) por 30 minutos.

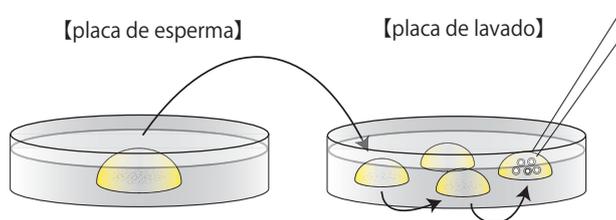


Inseminación

- 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.