

# 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.

## 4-1 Preparación de ovocitos micro-diseccionados con laser

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

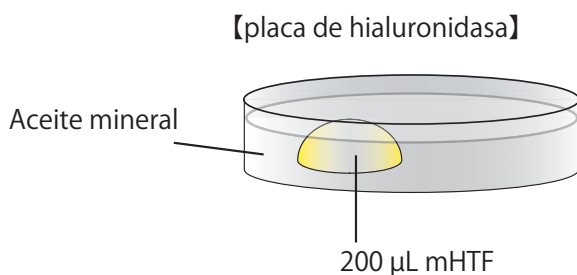
### Materiales y equipo

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

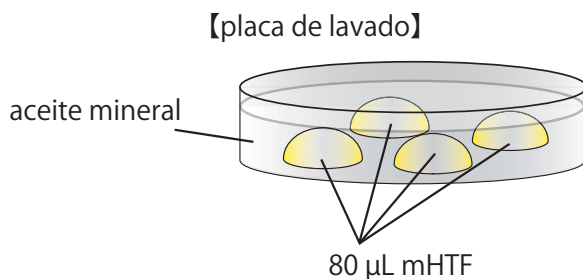
### Procedimientos

#### Preparación del esperma y las placas

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

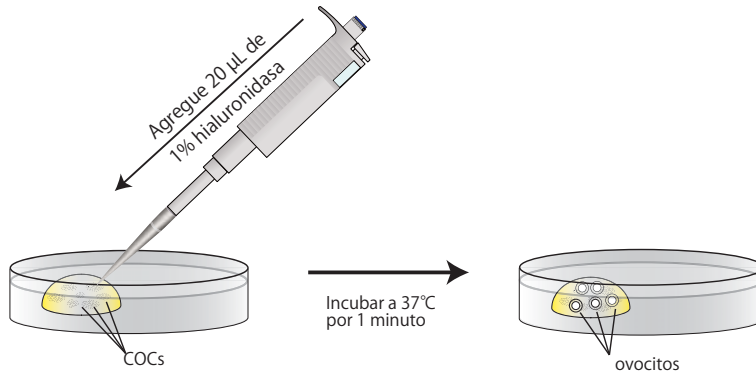


3. Coloque 4 gotas (80  $\mu$ L/gota) de mHTF en una placa. Cúbrela con aceite mineral y colóquela en el incubador (37°C, 5% CO<sub>2</sub> en aire) al menos durante 30 minutos.

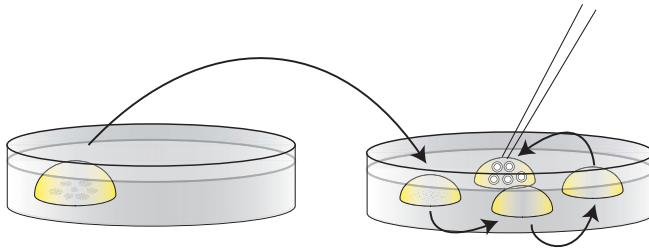


### Preparación de los ovocitos desnudos

1. Obtenga de los ratones hembras superovuladas los complejos ovocitos-cúmulos (COCs) y póngalos en la gota de 200  $\mu\text{L}$  de mHTF (placa de hialuronidasa). (Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 6 y 9.)
2. Agregue 20  $\mu\text{L}$  de 1% hialuronidasa a la gota de mHTF que contienen los COCs y mantenga la placa en incubador ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  en aire) por 1 minuto.

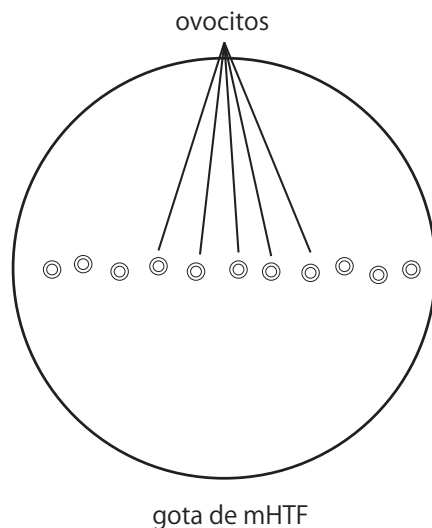


3. Rápidamente recolecte y transfiera los ovocitos a la gota de 80  $\mu\text{L}$  de mHTF (placa de lavado) y en turnos, lávelos pasándolos por las distintas gotas de la placa de lavado.



### Disección de la zona pelúcida usando un laser

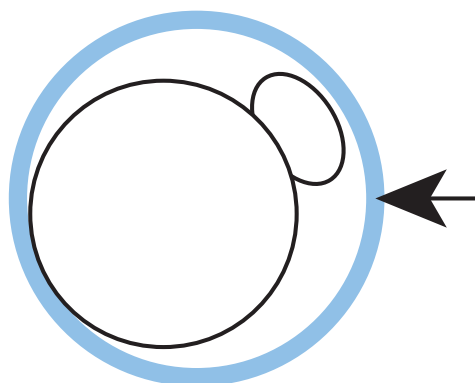
1. Coloque una gota de 100  $\mu\text{L}$  de mHTF en una placa. Cúbrala con aceite mineral y colóquela en el incubador ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  en aire) al menos por 30 minutos.
2. Transfiera 50 ovocitos desnudos a la gota de 100  $\mu\text{L}$  mHTF.
3. Coloque los ovocitos en línea en el fondo de la placa.



#### Comentario

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

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



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



- Después de diseccionar la zona pelúcida de todos los ovocitos, transféralos a la gota de MEDIO CARD® de fertilización. Coloque la placa en el incubador de CO<sub>2</sub>. Por favor, consulte a los capítulos de Fertilización *in vitro* en la página 6, Fertilización *in vitro* usando espermatozoos del epidídimo transportados en frío en página 18 y Fertilización *in vitro* usando espermatozoos criopreservados en página 26.)

## Referencias

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

### Nota

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

### Nota

El diámetro del orificio es de 10-12.5  $\mu\text{m}$  y la duración del pulso de 0.55-0.60 ms.

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

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

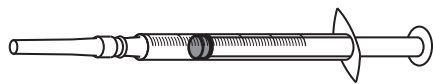
### Materiales y equipo

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

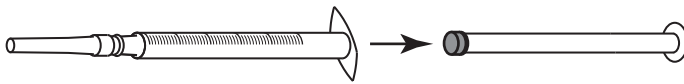
### Procedimientos

#### Preparación de la aguja para DPZ

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

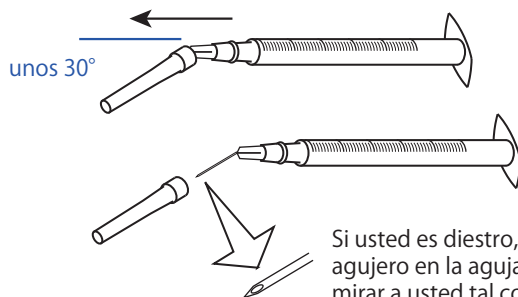


Coja una jeringa de 1 mL con una aguja 30 G.

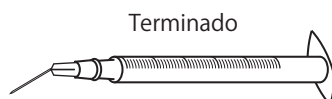


Quite y elimine el embolo.

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



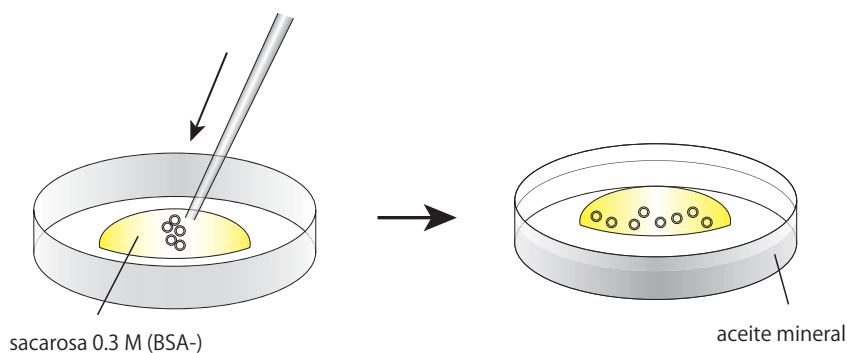
Si usted es diestro, el agujero en la aguja debe mirar a usted tal como los muestra el diagrama.



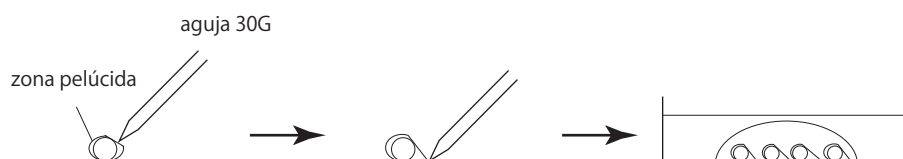
Terminado


**DPZ**

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

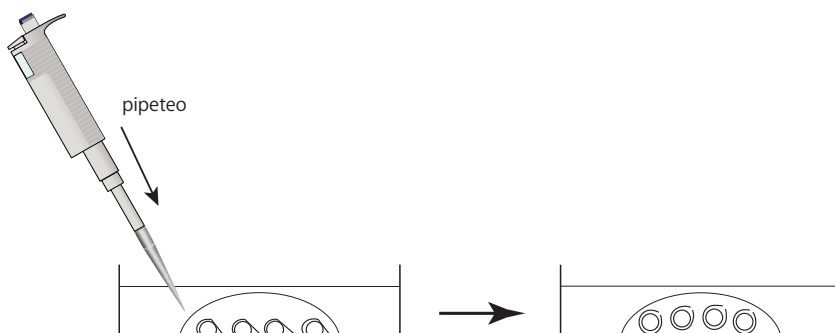


4. Bajo un microscopio binocular, diseccione parcialmente la zona pelúcida (DPZ) de los ovocitos mediante un simple movimiento hacia abajo con una aguja 30 G.



[DPZ] No. 09-01 

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



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

**Comentario**

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

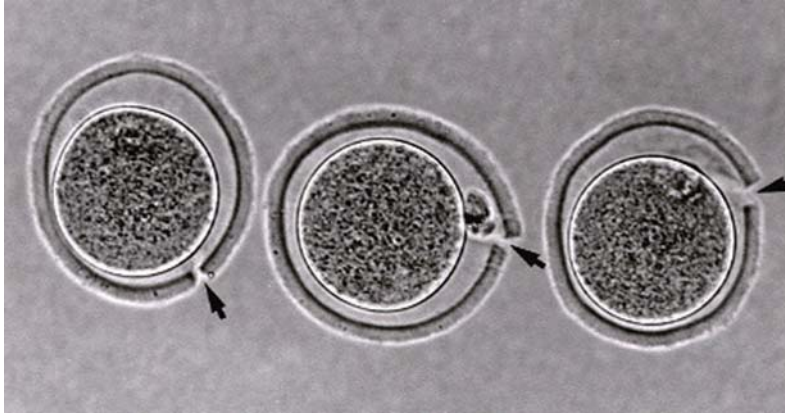
Como resultado. El espacio perivitelino se ensancha y los ovocitos se adosan al fondo de la placa.

**Comentario**

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



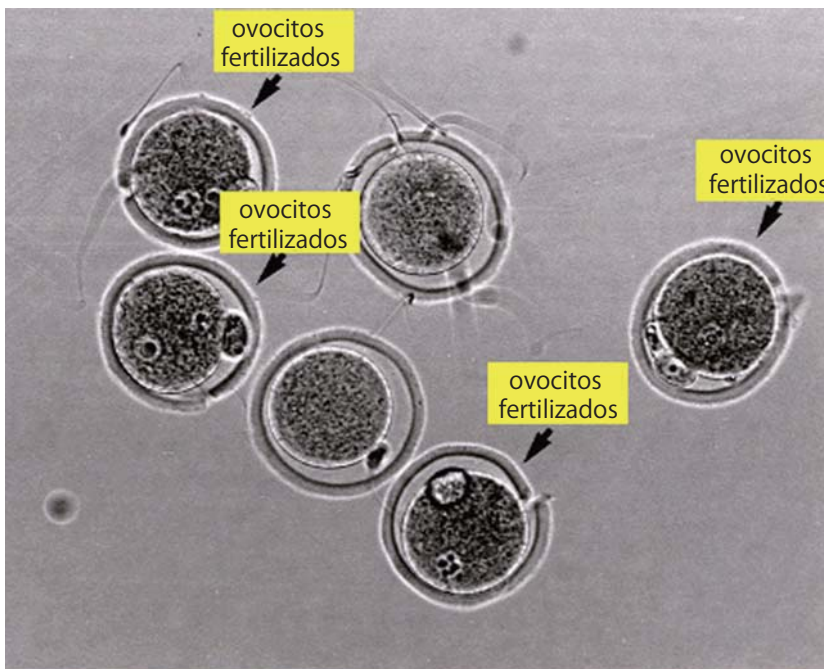
[Microfotografía: Ovocitos DZP]



### Fertilización *in vitro* y transferencia embrionaria

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

[Microfotografía: Ovocitos fertilizados]



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

### Referencias

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

### Comentario

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

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

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

### Materiales y equipo

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

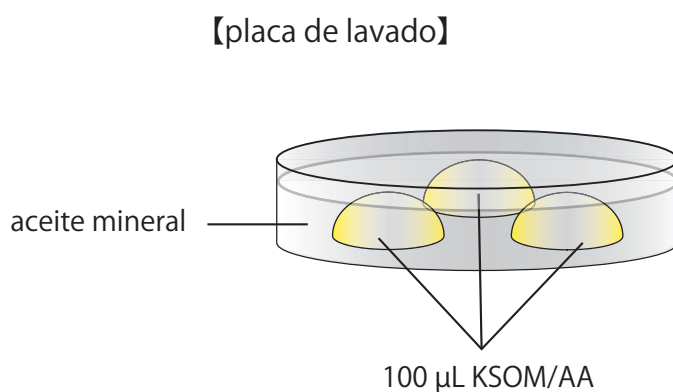
### Procedimientos

#### Superovulación y selección de las hembras con tapón

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

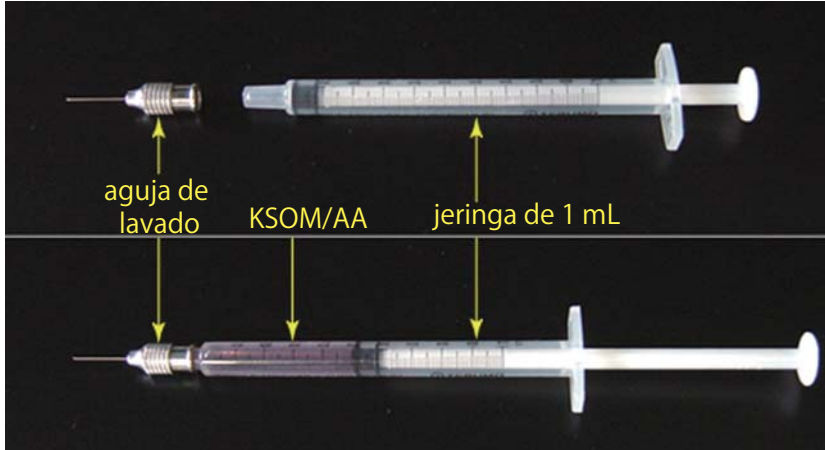
#### Preparación de las placas

1. Coloque 3 gotas (100  $\mu$ L / gota) de KSOM/AA en una placa y cúbralas con aceite mineral. Ponga la placa en un incubador (37°C , 5% CO<sub>2</sub> en aire) por un mínimo de 30 minutos.



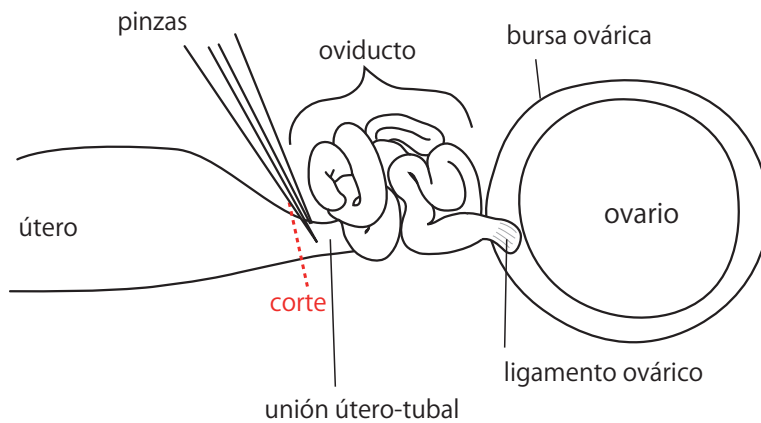
### Preparación de la aguja de lavado

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

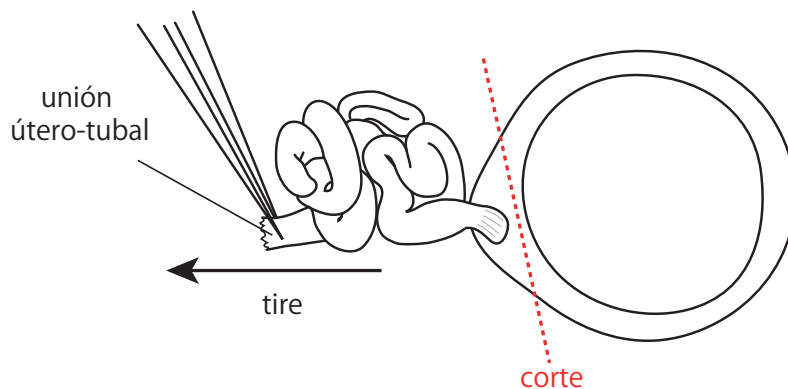


### Obtención de embriones

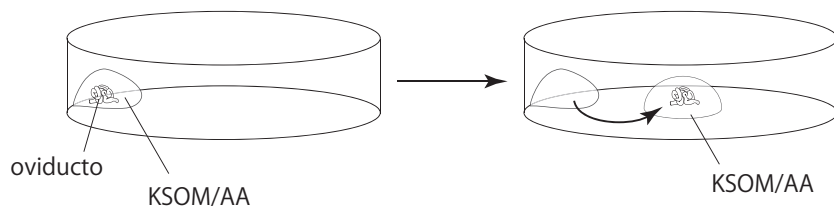
1. El día después en que se observe el tapón vaginal, obtenga el útero, oviducto y ovarios de las hembras y colóquelas sobre un papel de filtro estéril. (Por favor, consulte con el capítulo Fertilización *in vitro* en la página 9.)
2. Pince en la unión útero-tubal y haga un corte en la región uterina.



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

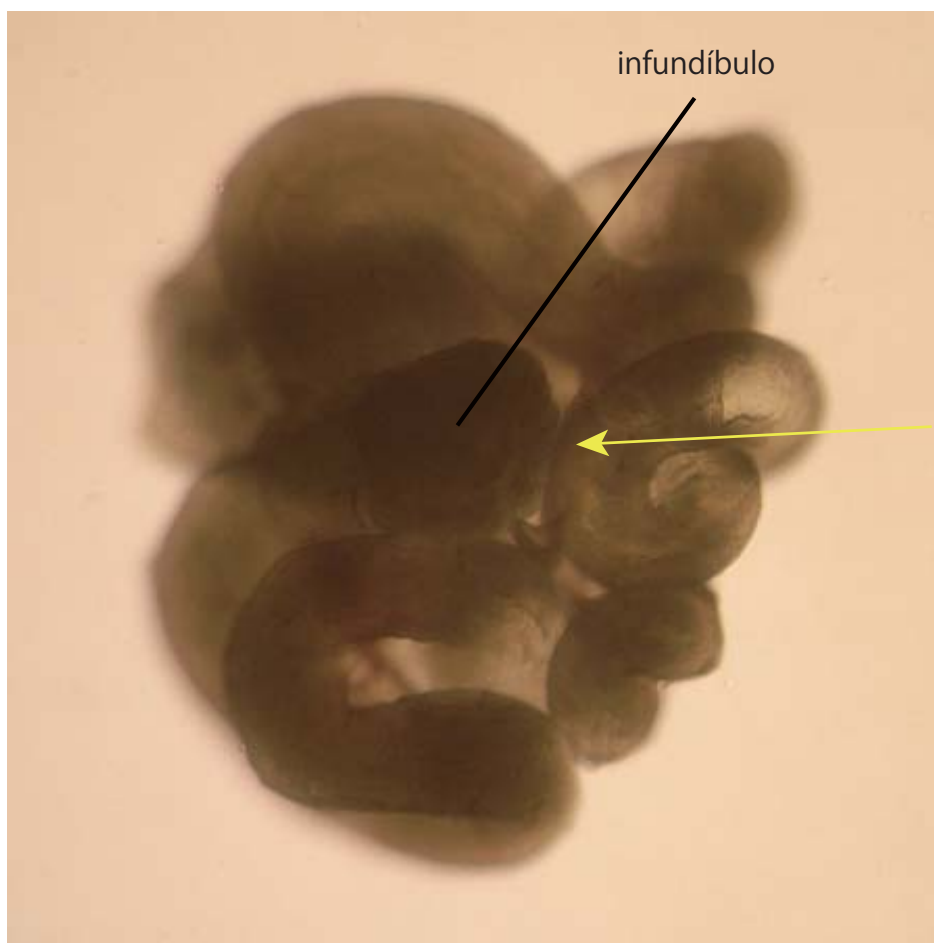


- Después de lavar el oviducto en una gota de KSOM/AA, póngalo en otra gota de KSOM/AA.



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

[Microfotografía: un oviducto antes de lavarlo]



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

#### Nota

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

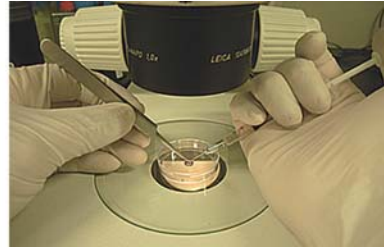
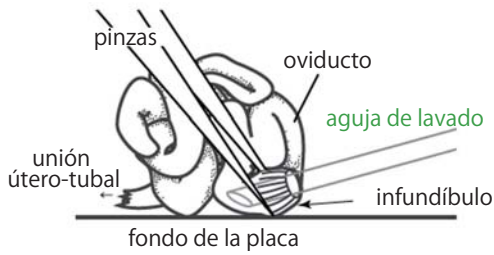
#### Comentario

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

#### Nota

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

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

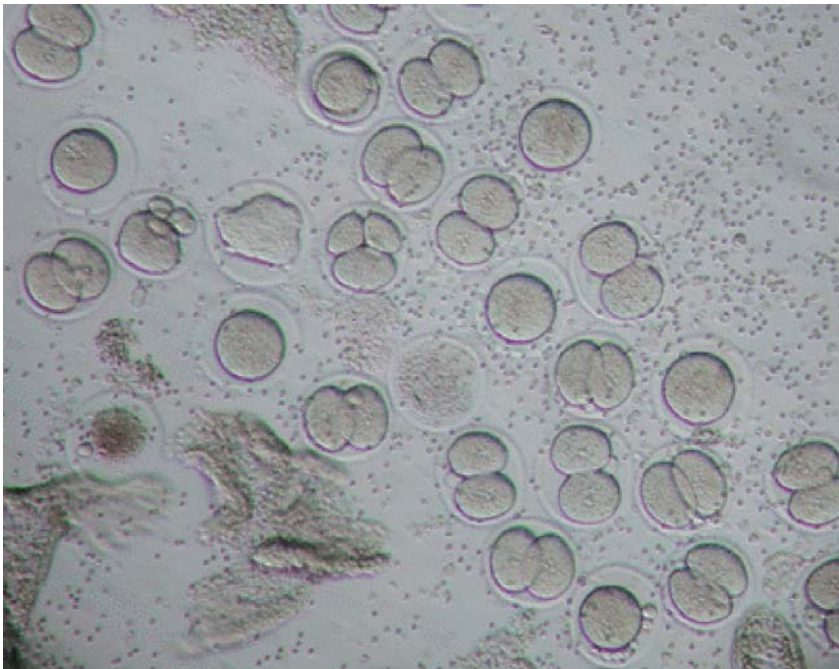


[lavado] No. 10-01



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

[Microfotografía: oviducto luego del lavado]



### Nota

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

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

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

### Nota

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

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

## Referencias

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