

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 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.

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

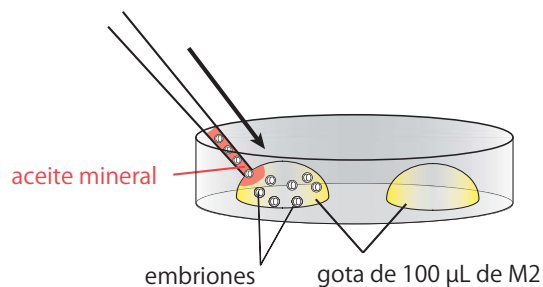
Materiales y equipo

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)

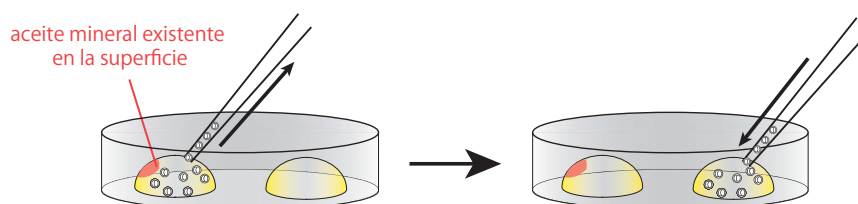
Procedimientos

Mantenimiento en frío de embriones a 2-celulas

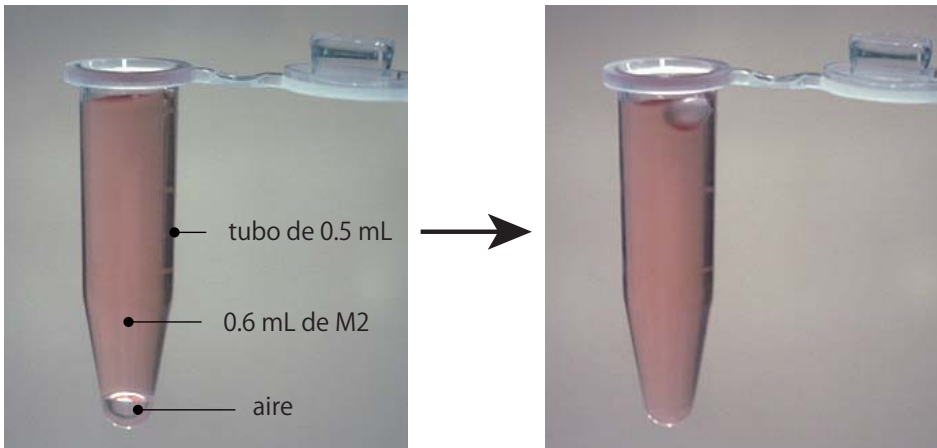
1. Ponga en una placa de plástico dos gotas de 100 μ L de M2.
2. Transfiera los embriones a 2-celulas del medio de cultivo a la gota de M2.



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

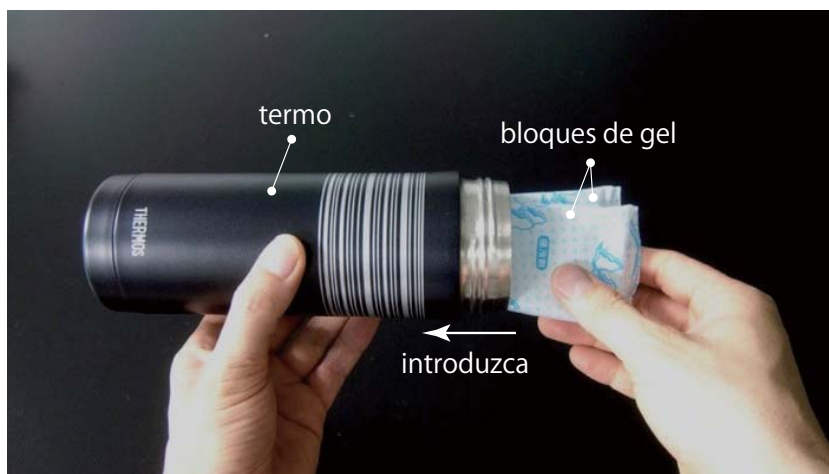
Prepare una caja de papel con los embriones de 2-celulas de la misma forma que se describió anteriormente (Mantenimiento en frio de embriones de 2-celulas)

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.



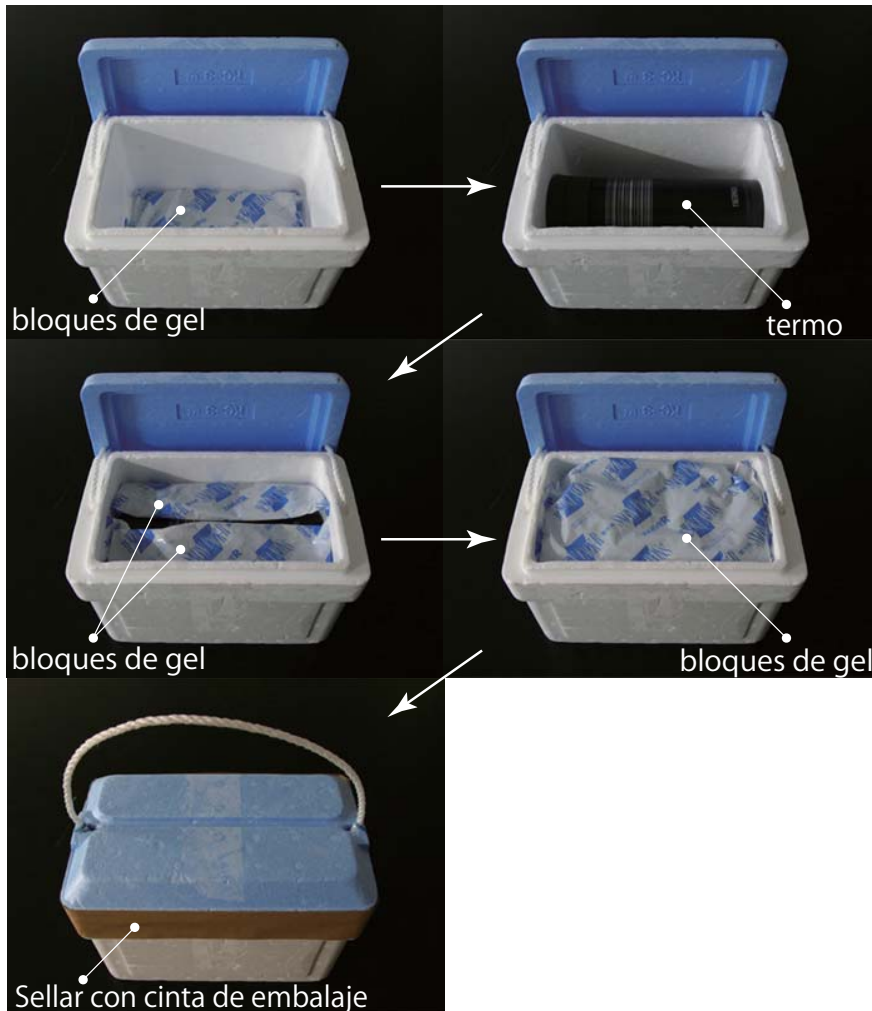
2. Introduzca dos bloques pequeños de gel frio dentro del termo.



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.

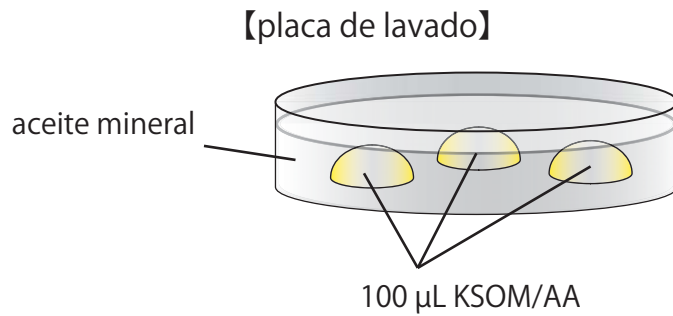
Nota

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 μ L / 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.

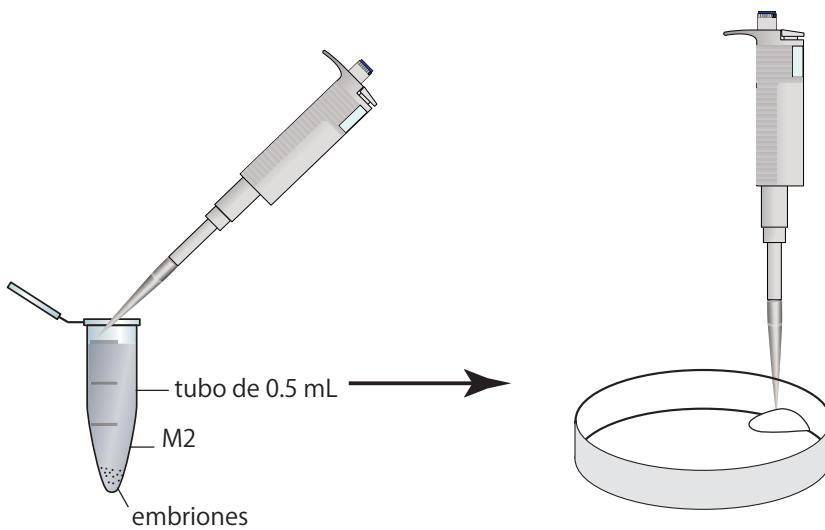


2. Retire del termo la caja de papel con los embriones.
3. Deje la caja de papel a temperatura ambiente por 30 minutos.

[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 μ L 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.

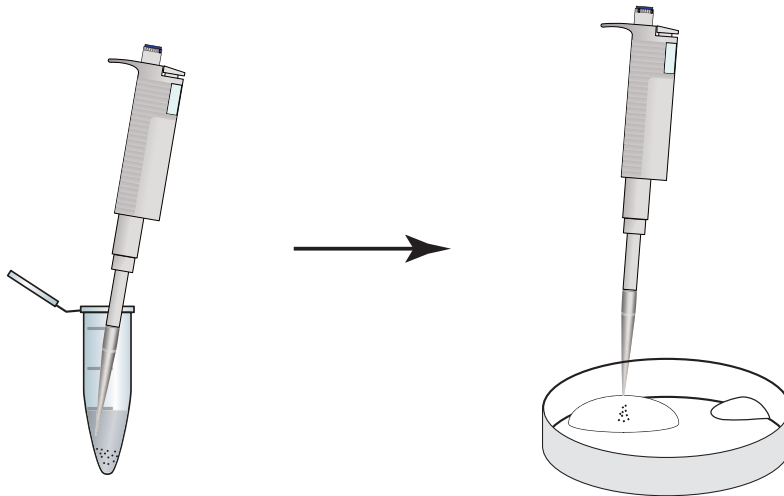
Comentario

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

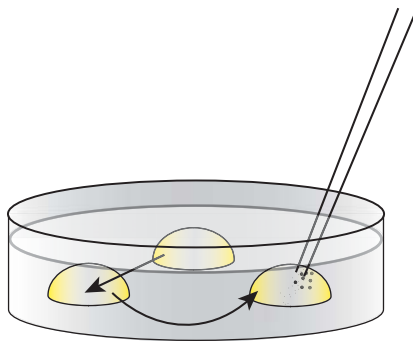
Comentario

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)

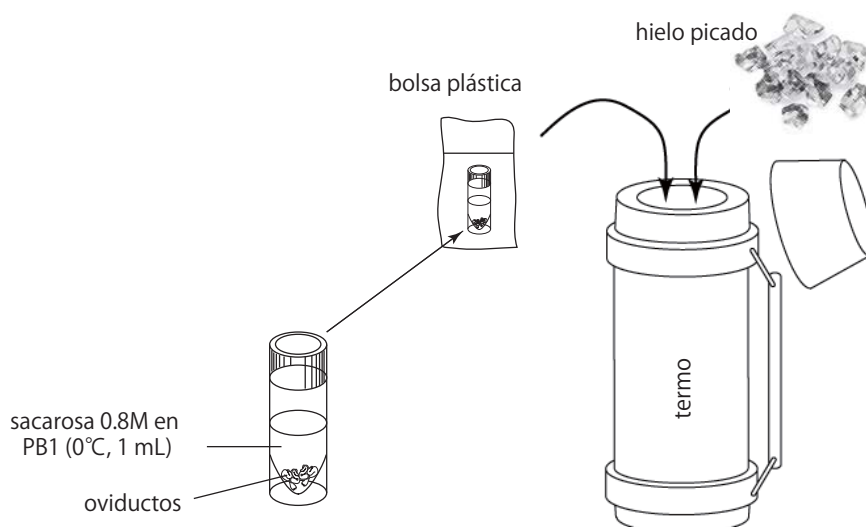
Procedimientos

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.)

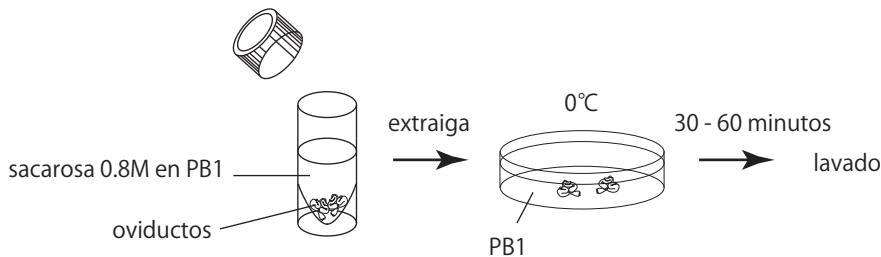
Transporte de los oviductos de ratón

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 vitificación simple de embriones de ratón en la página 54.)