

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.

6-1 Vitrificación simple de embriones de ratón

Materiales y equipo

1. 1 M DMSO
2. DAP213
3. Placa de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
4. Filtro (Millex-GV 0.22 μm Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
5. Punta de pipeta para cargar geles (MBP Gel 200, Cat. No. 3621; Molecular BioProducts)
6. Pipetas de transferencia
7. Criotubos (Se recomienda el Cryogenic Vials Cat. No. MS-4501W; Sumitomo Bakelite, Japan. Si no puede obtenerlo, use Cat. No. 366656; NUNC.)
8. Micropipeta
9. Caña de viales o tubos
10. Nalgene Labtop Cooler (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA)
11. Nitrógeno líquido
12. Microscopio
13. Sacarosa 0.25 M
14. KSOM/AA
15. Aceite mineral

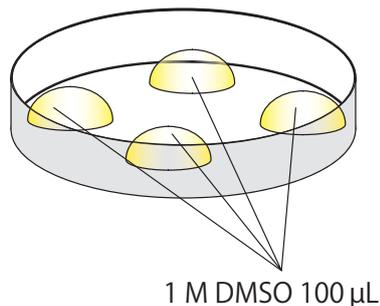
Procedimientos

Preparación del bloque refrigerante y de los criotubos

1. Un día previo a su uso coloque el bloque refrigerante (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA) en un congelador a -20 .
2. Unos 10 minutos antes de comenzar la vitrificación saque el bloque refrigerante del congelador.
3. Ponga algunos criotubos en el bloque refrigerante. Unos 40 embriones por criotubo es fácil de manipular, en otras palabras, cuando se quiera vitrificar 120 embriones, se debería colocar tres tubos en el bloque refrigerante.
4. Justo antes de comenzar el procedimiento, verifique que la temperatura dentro de los tubos esta a 0°C .

Vitrificación

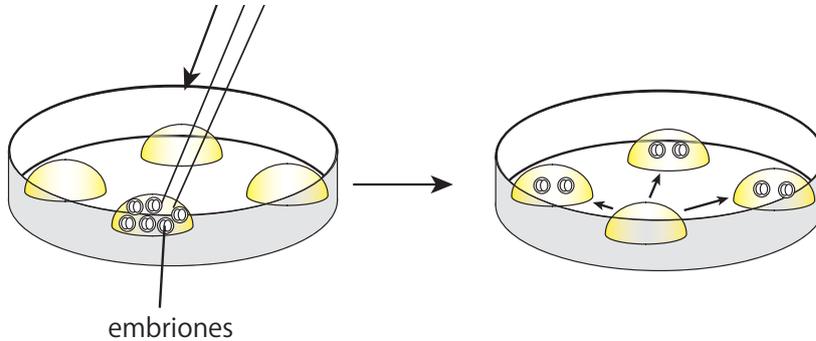
1. Filtre el DMSO 1M y ponga 4 gotas ($\sim 100 \mu\text{L}$ /gota) en una placa. Una gota es para lavar los embriones sacados del medio de recolección, mientras que las otras es para contener los embriones lavados.



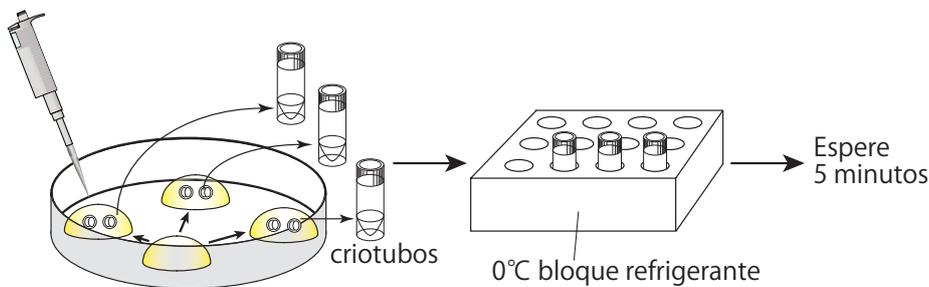
Comentario

Se puede usar hielo picado en lugar del bloque refrigerante.

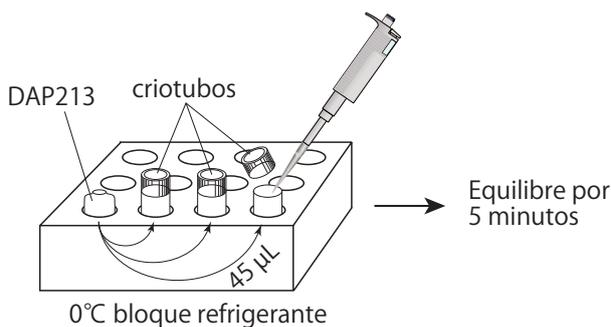
- Coloque un grupo de embriones en una de las 4 gotas para enjuagarlos del medio de recolección. Distribuya los embriones ya enjuagados en partes iguales entre las otras gotas. Estas alícuotas eventualmente serán transferidas al criotubo. Por ejemplo, si uno tuviera que recolectar 120 embriones y vitrificarlos en alícuotas de 40 embriones, los embriones serían colocados primero en la gota de enjuague y luego se dividen equitativamente entre las 3 otras gotas.



- Usando una pipeta de 20 μL y una punta para cargar geles, transfiera los embriones contenidos en 5 μL de la solución de DMSO 1M a un criotubo. Una vez transferidos, coloque el criotubo en el bloque refrigerante a 0°C y espere 5 minutos.



- Agregue 45 μL de la solución crioprotectora (DAP213) a 0°C al criotubo y equilibre por 5 minutos en el bloque refrigerante a 0°C.



Nota

Es posible mantener los criotubos en el bloque refrigerante por más tiempo que 5 minutos (<20 minutos).

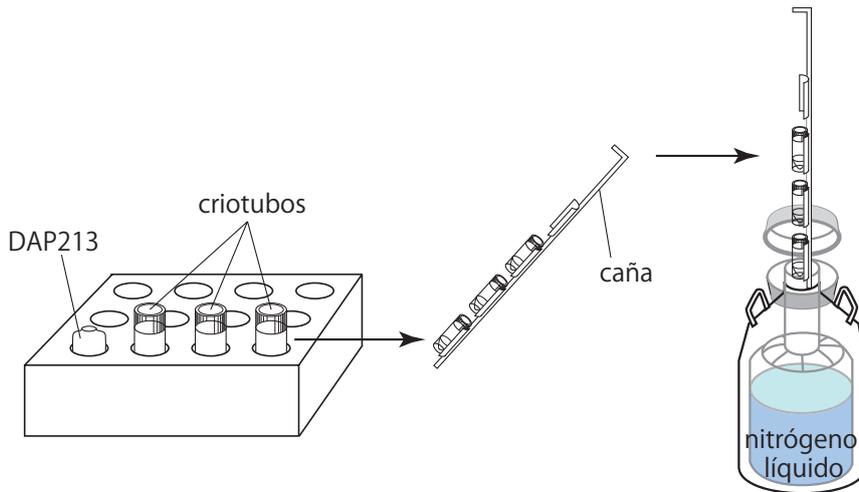
Nota

Si los embriones son agrupados en el centro de la gota, es más fácil aspirarlos todos juntos en 5 μL de la solución de DMSO 1M.

Nota

No ajusten con fuerza la tapas de los tubos después de agregarle el DAP213, sino, será muy difícil quitarla rápidamente cuando las muestras sean extraídas del tanque de nitrógeno.

- Rápidamente ponga los criotubos en una caña de aluminio y sumerja directamente las muestras en el nitrógeno líquido.



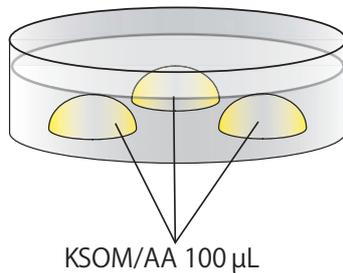
[Vitrificando embriones] No. 13-01



Preparación para el descongelado

- Ponga 3 gotas (100 μ L/gota) de KSOM/AA en una placa y cúbralo con aceite mineral. Coloque la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por al menos 30 minutos.

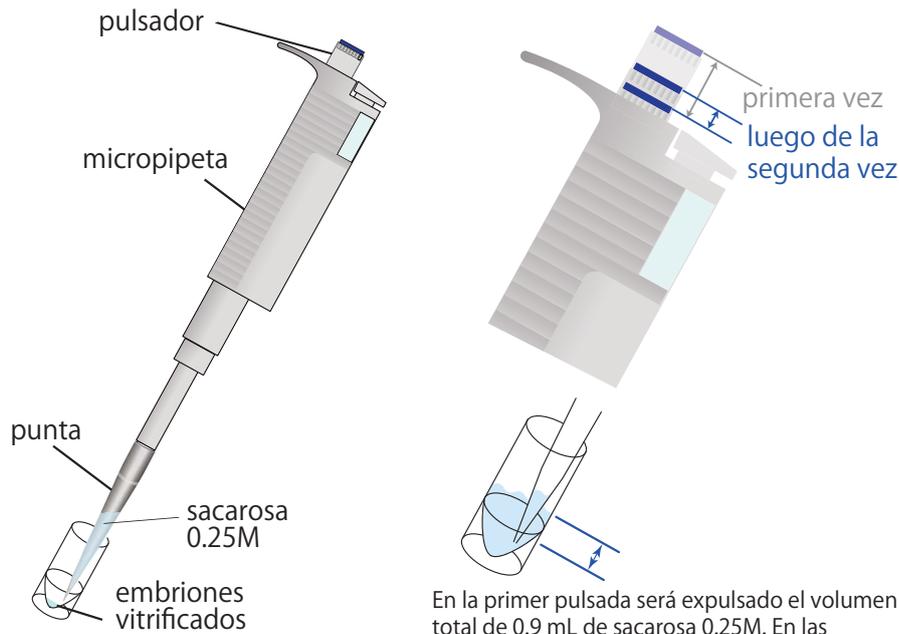
【placa de lavado】



- Caliente una solución de sacarosa 0.25M en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) antes de su uso.

Recuperación de embriones vitrificados

- Saque del nitrógeno líquido la muestra elegida y abra la tapa del criotubo. Descarte todo resto de nitrógeno líquido que haya en el tubo y déjelo a temperatura ambiente por 30 segundos.
- Agregue al criotubo 0.9 mL de sacarosa 0.25M (precalentado a 37°C) y descongele la muestra rápidamente pipeteando las soluciones. Cuando pipetee tenga cuidado de no generar mucha cantidad de burbujas y de no dañar físicamente los embriones pipeteando muy rápido. Una vez descongelado, transfiera el contenido del criotubo a una placa de cultivo.



La punta de pipeta no deberá tocar el fondo del criotubo. Si lo hiciera, la sacarosa 0.25M que se encuentra en la punta se congelara y no podrá descargar la solución en el tubo.

En la primer pulsada será expulsado el volumen total de 0.9 mL de sacarosa 0.25M. En las pulsadas subsiguientes, se limita la presión a cerca de un decimo del volumen de sacarosa 0.25M que se ha aspirado serán expulsados. De esta forma pipeteando volúmenes pequeños se previene la formación de burbujas en la solución de sacarosa.

3. Coloque unos 0.4-0.5 mL de sacarosa 0.25M mas en el criotubo y transfiera el contenido a una placa. Esto diluye aun más el crioprotector y asegura que todos los embriones hayan sido transferidos.

[Recuperación de embriones vitrificados]

No. 13-02

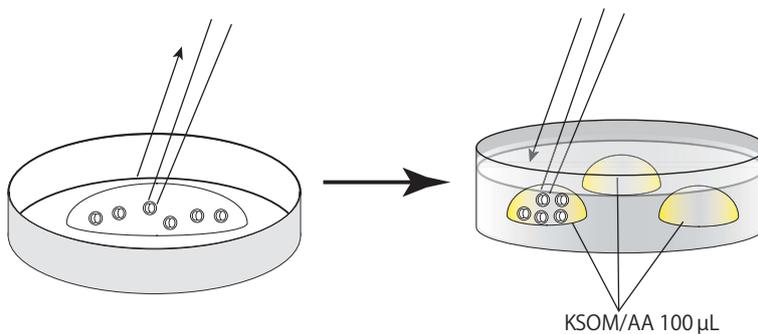


[Pipeteando para recuperar los embriones vitrificados]

No. 13-03



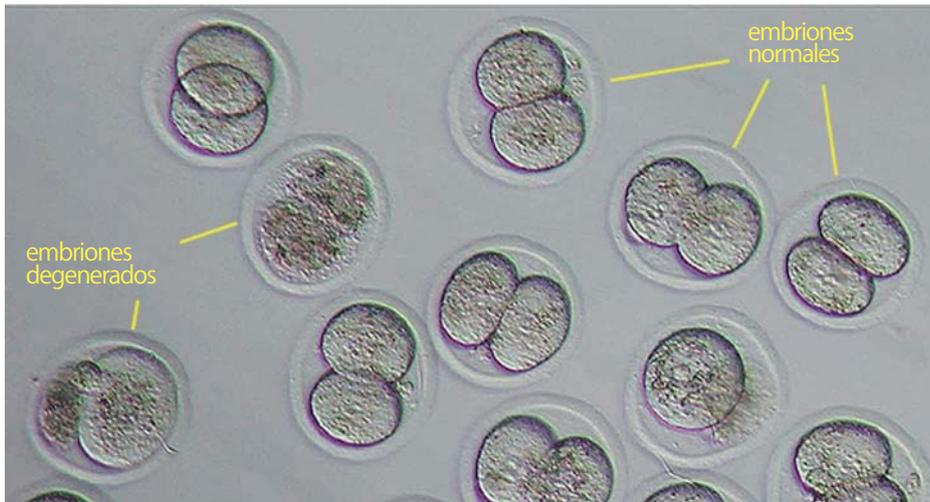
4. Aspire los embriones del medio y cuidadosamente transféralos a una gota de KSOM/AA (placa de lavado), después manténgalos en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire).



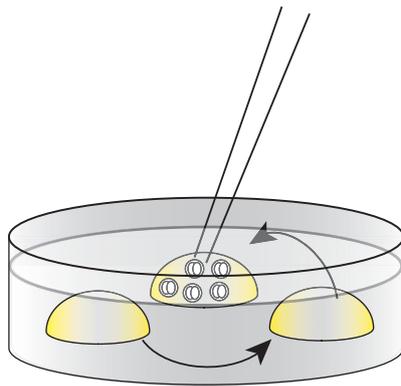
Nota

Es muy importante descongelar rápidamente la muestra para evitar dañar los embriones con la toxicidad de la solución crioprotectora (DAP213).

[Microfotografía: Embriones recuperados después de la vitrificación]



- Después de 10 minutos, lave los embriones pasándolos consecutivamente por 2 gotas de KSOM/AA (placa de lavado).



Referencias

- Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.* **87**: 479-483.
- Nakagata N. 1993. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization between cryopreserved gametes. *J. Reprod. Fert.* **99**: 77-80.
- Nakagata N. 1995. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp. Anim.* **44**: 1-8.
- Nakao K., Nakagata N., and Katsuki M. 1997. Simple and efficient procedure for cryopreservation of mouse embryos by simple vitrification. *Exp. Anim.* **46**: 231-234.

6-2 Vitricación simple de ovocitos de ratón

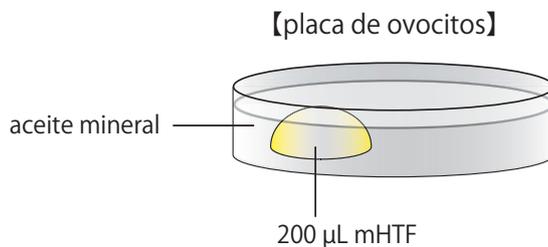
Materiales y equipo

1. Ratones hembras superovuladas con PMSG y hCG
2. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
3. Aceite mineral
4. Micropipeta
5. Puntas de pipeta
6. mHTF
7. Hialuronidasa 1% en mHTF
8. Suero fetal bovino (FBS Cat. No. 26140-087; Gibco)
9. Filtro (Millex-GV 0.22 μ m Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
10. Capilares de vidrio para la manipulación de embriones
11. Incubador humidificado (37°C , 5% CO₂ en aire)
12. Materiales y equipo usado para la vitricación y descongelamiento de los embriones (Para el lavado de ovocitos descongelados se utilizan gotas de mHTF) (Por favor, consulte al capítulo de vitricación simple de embriones de ratón en la página 54.)

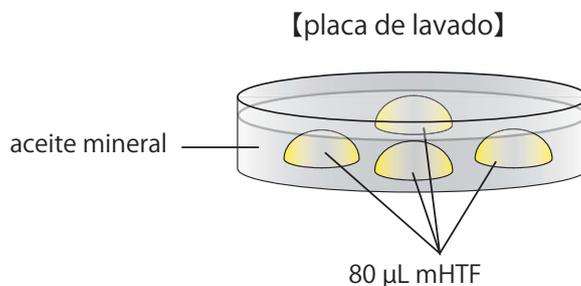
Procedimientos

Preparación de las placas

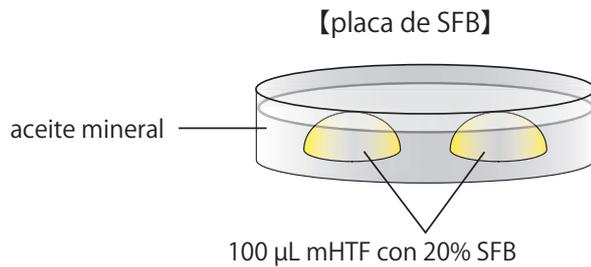
1. Coloque un agota de 200 μ L de mHTF en una placa. Cúbrala con aceite mineral y colóquela en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) al menos durante 30 minutos.



2. Ponga 4 gotas (80 μ L/gota) de mHTF en una placa. Cúbralo con aceite mineral y coloque la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) al menos durante 30 minutos.

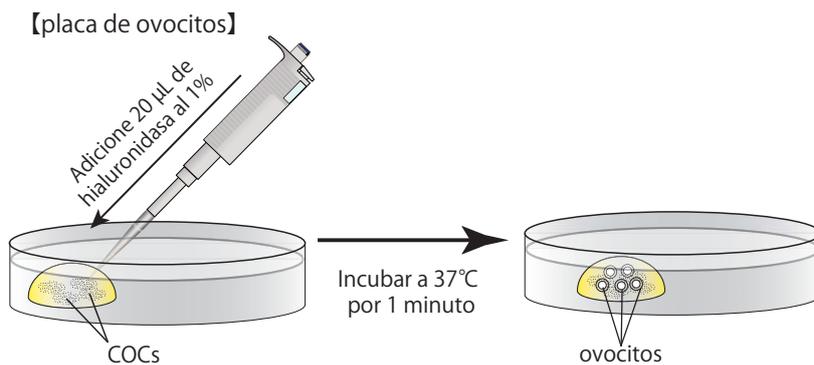


3. Prepare mHTF con 20% de SFB, esterilícelo por filtración. Ponga 2 gotas (100 μ L/gota) del medio en una placa. Cúbralo con aceite mineral y colóquelo en un incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) al menos durante 30 minutos.

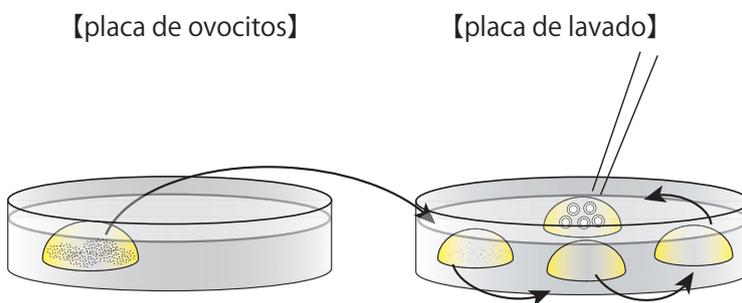


Preparación de los ovocitos denudados

1. Obtenga de un ratón hembra superovulada los complejos ovocitos-cúmulos (COCs) y colóquelos en una gota de 200 μ L de mHTF (Placa de ovocitos). (Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 9.)
2. Añada a la gota de mHTF que contiene los COCs 20 μ L de hialuronidasa al 1% y mantenga la placa en el incubador (37°C , 5% CO₂ en aire) por 1 minuto.



3. Rápidamente recolecte y transfiera los ovocitos a una gota de 80 μ L de mHTF (Placa de lavado), lávelos pasándolos por las gotas en la placa de lavado.



Nota

Asegúrese de llevar a cabo todas las operaciones, desde el sacrificio de la hembra para obtener sus oviductos hasta introducir los COCs en la gota de mHTF (placa de ovocitos) en el menor tiempo posible (dentro de 30 segundos).

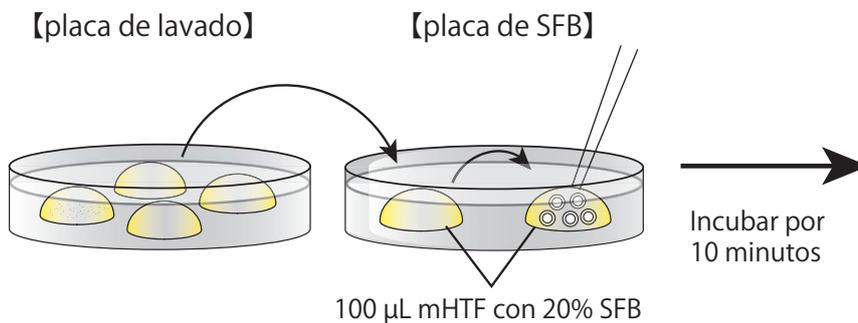
Más aun, cuando trabaje solo, no sacrifique muchos ratones a la vez; es preferible sacrificar uno y rápidamente obtener los oviductos antes de continuar con el ratón siguiente.

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.

Cultivo de ovocitos en una gota con SFB

1. Transfiera los ovocitos a la primer gota de la placa SFB para enjuagarlos. Después, transféralos a la segunda gota para incubarlos (37°C, 5% CO₂ en aire) por 10 minutos.



Comentario

El SFB ayuda a prevenir el endurecimiento de la zona pelúcida del ovocito durante la vitrificación y descongelación.

Vitrificación simple de ovocitos de ratón

1. Los ovocitos pueden ser vitrificados usando el método de vitrificación para embriones. Se han de remover las células del cúmulo y cultivarlos en una gota que contenga SFB. Más aun, el método de descongelamiento es el mismo que para los embriones. Por favor, consulte el capítulo de Vitrificación simple de embriones de ratón en la página 54.

Fertilización *in vitro* usando ovocitos vitrificados-descongelados.

1. Los ovocitos vitrificados y descongelados pueden usarse para fertilización *in vitro* usando espermatozoides frescos, transportados en frío o congelados y descongelados. Consulte a 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.

References

1. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., Kondo T., Haruguchi Y., Takeshita Y., Nakamura Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Ishizuka Y., Araki K. 2013. Applications of cryopreserved unfertilized mouse oocytes for *in vitro* fertilization. *Cryobiology*. 67(2):188-92.

Nota

Hay tres métodos diferentes de preparar el MEDIO CARD®, dependiendo de si la fertilización *in vitro* será llevada a cabo usando espermatozoides frescos, congelados y descongelados o transportados en frío. Por favor, consulte el manual de instrucciones del MEDIO CARD®.

6-3 Vitricación y trasplante de ovarios de ratón

Materiales y equipo

1. Placas de cultivo 35-mm estériles
2. mWM
3. Donante: Ratón hembra (1 día a 30 semanas de edad)
4. Receptora: Ratón hembra de cuatro semanas (una cepa que sea histocompatible con el ovario trasplantado)
5. Anestesia
6. Tijeras de micro-disección con muelle (5 mm de hoja)
7. Pinzas de relojero #5
8. Grapa de sutura (Autoclip 9 mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador (Mik-Ron Auto-clip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
9. Placa térmica (37°C)

Procedimientos

Obtención de los ovarios

1. Sacrifique la hembra donante y extraiga sus ovarios. (Por favor, consulte al capítulo de Fertilización *in vitro* en la página 9.)
2. Coloque los ovarios en una placa que contenga un volumen adecuado de mWM.

Vitricación

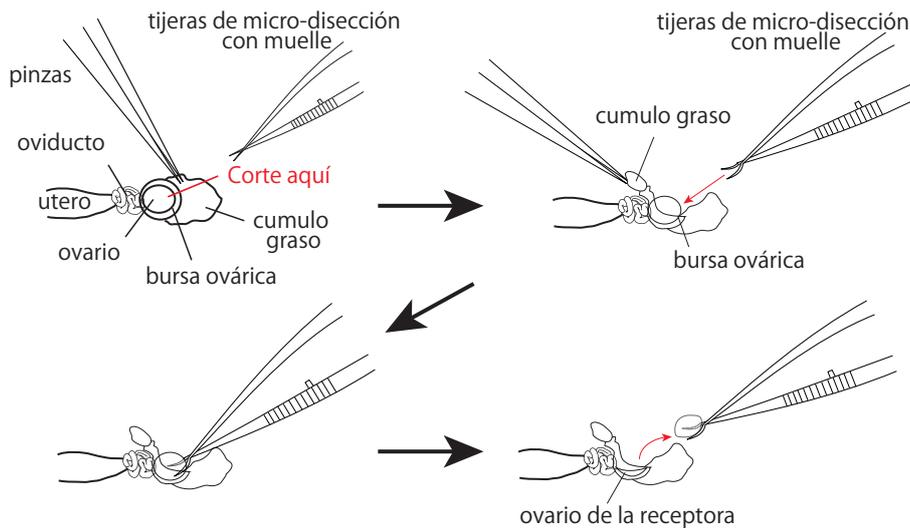
1. Los ovarios se pueden criopreservar con el mismo método usado para embriones. (Consulte al capítulo de Vitricación simple de embriones de ratón en la página 54.)

Trasplante

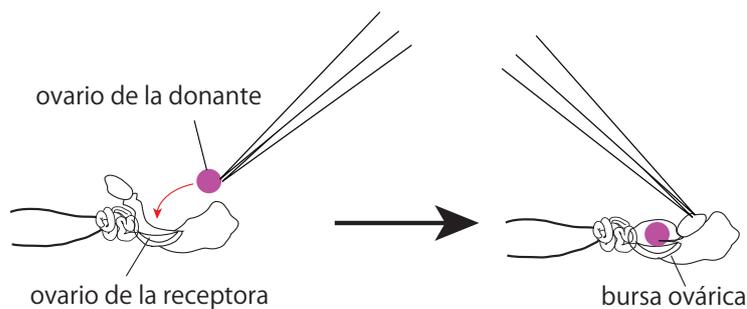
1. Anestesia la hembra receptora.
2. Extraiga el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino como en el procedimiento convencional. (Por favor, consulte al capítulo de transferencia embrionaria en oviducto en la página 67.)
3. Usando unas tijeras de micro-disección con muelle, corte aproximadamente 1/4 de la bursa ovárica de la receptora y algo de la grasa que la rodea. Levante el colgajo de grasa para poder ver el ovario.
4. Corte 1/2-2/3 del ovario usando las tijeras de micro-disección con muelle de hoja curva.

Comentario

Usando las tijeras de micro-disección con la hoja curva es más fácil colocar el ovario donante sobre el ovario residual de la receptora.



- Implante el ovario de la donante en el ovario residual de la receptora y cúbralo con la bursa ovárica.



[Trasplante de ovario de ratón] No. 15-01



- Empuje el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino dentro del abdomen y cierre la incisión usando grapas de sutura.
- Repita el mismo proceso descrito anteriormente con el otro ovario de la receptora.
- Mantenga el ratón sobre una placa térmica a 37°C hasta que se recupere de los efectos de la anestesia.

Referencias

- Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song S.Y., Kuramochi T., Azuma S., Nishijima M., and Yokoyama M. 2003. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol. Reprod.* **68**: 881-887.
- Tsuchiyama S., and Nakagata N. 2009. Cryopreservation of ovaries from elderly female mice. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 248.