

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.

7-1 Vasectomía para la obtención de machos estériles

Materiales y equipo

1. Ratón macho (5 semanas de edad)
2. Anestésico
3. Tijeras finas
4. Pinzas de relojero #5
5. Grapa de sutura (Autoclip 9 mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador (Mik-Ron Auto-clip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
6. Placa térmica (37°C)

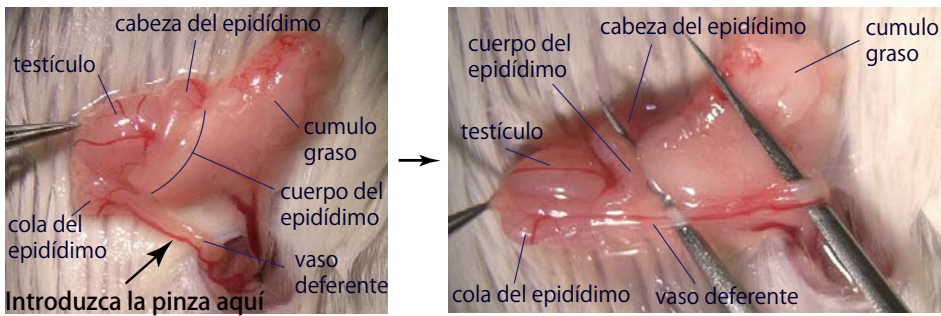
Procedimientos

Vasectomía

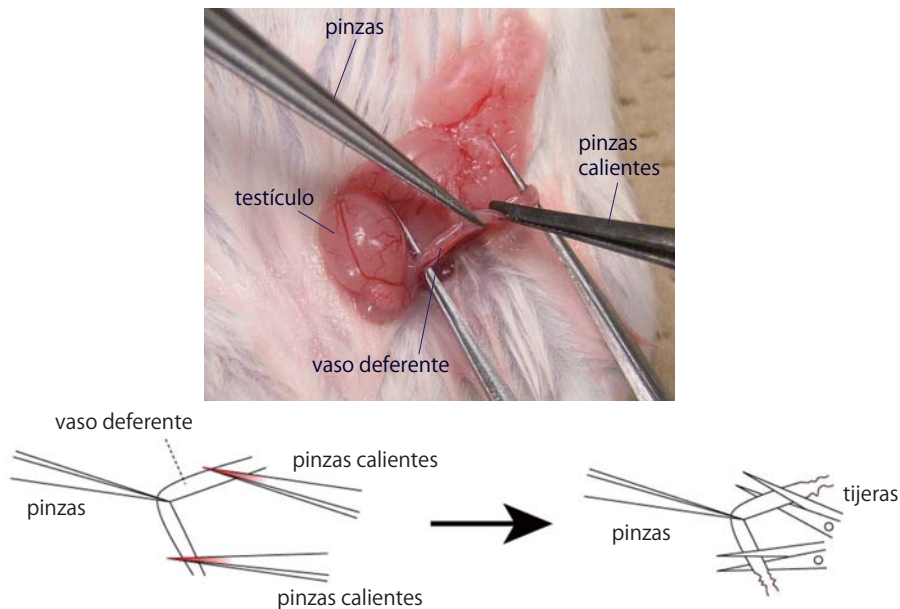
1. Anestesia un ratón macho.
2. De acuerdo con el procedimiento convencional haga una incisión en la línea media. La incisión deberá comenzar a nivel del punto superior de la pata trasera y extenderse aproximadamente 1cm de este punto hacia la cabeza del ratón. Luego de hacer la incisión, saque los testículos, el epidídimo y parte del vaso deferente de la cavidad abdominal.



- Con las pinzas levante el vaso deferente e introduzca otras pinzas por debajo para separar el vaso deferente de los otros tejidos.



- Sujete el vaso deferente con unas pinzas y cauterice el vaso en dos puntos usando unas pinzas calientes como se muestra en el diagrama de abajo.
- Corte la porción del vaso deferente que ha quedado entre las dos cauterizaciones.



- Empuje el testículo, epidídimo y parte del vaso deferente dentro de la cavidad abdominal, después cierre la incisión usando grapas de sutura.
- Repita los pasos 2-6 con el otro testículo.

Referencias

- 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.

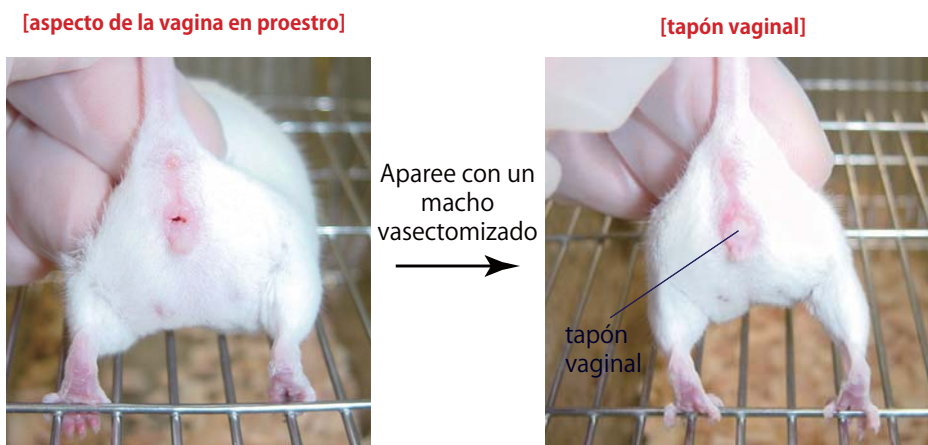
Comentario

Después de completar la cirugía, estabule cada ratón individualmente. Si el ratón es estabulado en grupo, es muy posible que peleen y puede que algunos se maten. Los machos vasectomizados estarán listos para ser empleados no antes de las 8 semanas de vida.

7-2 Transferencia embrionaria en oviducto

En nuestro laboratorio transferimos los embriones de 2-celulas a través de la pared del oviducto de las receptoras pseudo-preñadas. Este procedimiento es más fácil y simple de realizar que el procedimiento de transferencia embrionaria convencional, y es por lo tanto conveniente para técnicos sin experiencia.

Materiales y equipo

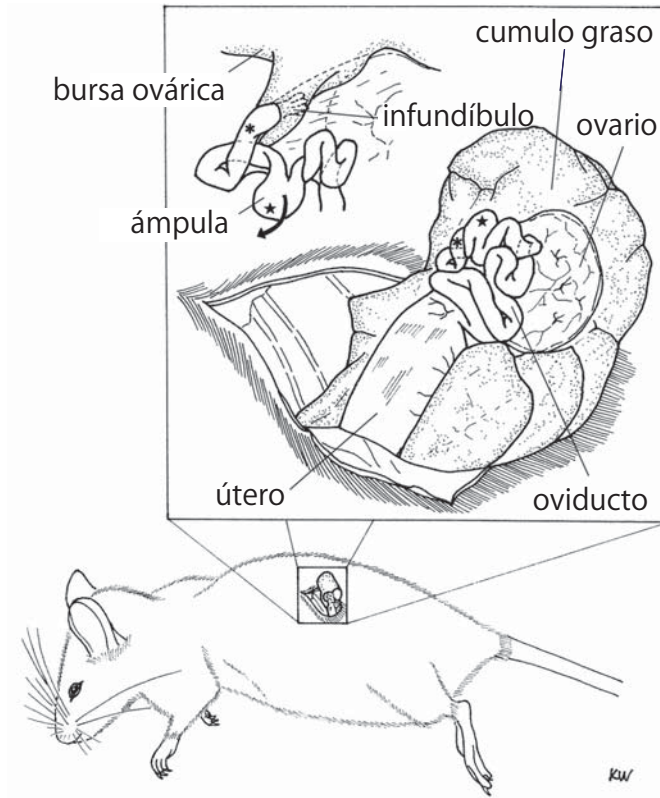


1. Ratón hembra en día 1 de pseudo-preñez (el día en que se observa el tapón vaginal)
2. Anestésico
3. Tijeras de micro-disección con muelle (hoja de 5 mm)
4. Pinzas de relojero #5
5. Pinza Bulldog (serrafine)
6. Grapa de sutura (Autoclip 9mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador de grapas (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
7. Placas de plástico (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Capilares de vidrio para manipulación y transferencia embrionaria
9. Placa térmica (37°C)

Procedimientos

Preparación del ratón

1. Anestesia un ratón hembra.
2. Extraiga el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino.

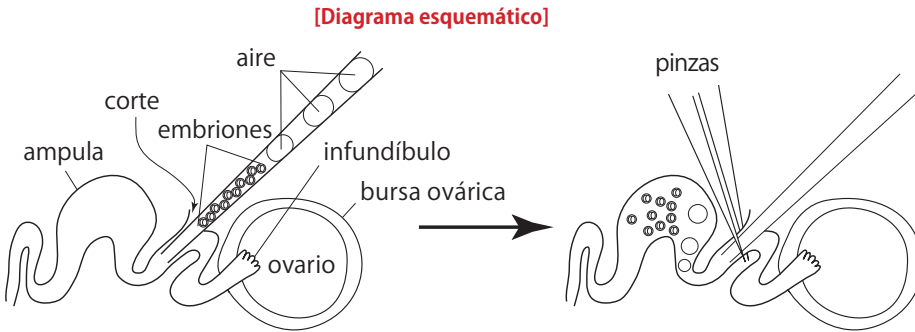


3. Coloque la pinza bulldog en el cumulo graso adosado a la bursa ovárica.



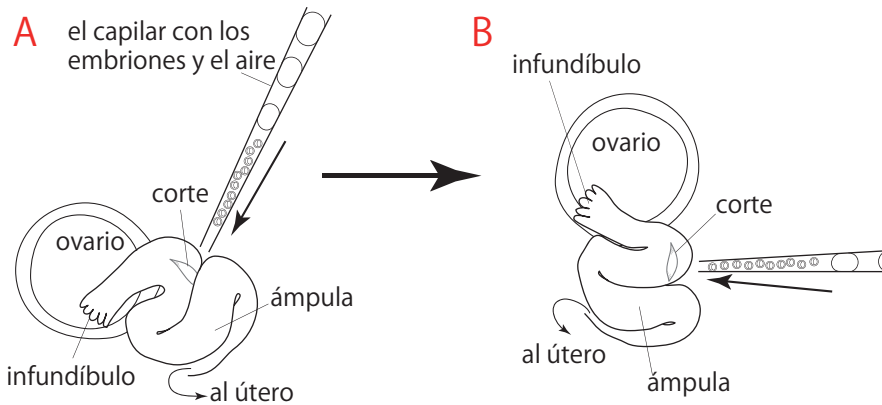
Colocando el oviducto

Como se indica en el diagrama siguiente, la transferencia embrionaria en oviducto se lleva a cabo cortando el oviducto, insertando el capilar dentro y liberando los embriones en dirección a la ampulla.



Desafortunadamente los oviductos del ratón son pequeños y los conductos están plegados de una manera complicada, como se muestra en el diagrama del oviducto exteriorizado esquematizado abajo (A). Esto hace muy difícil introducir el capilar en el oviducto en dirección a la ampulla por que la inserción se hace por arriba.

Para hacer este procedimiento más simple, posicione el oviducto cambiando la posición de la pinza serrafina y del ratón antes de comenzar la operación (B).



1. Observe el oviducto bajo una lupa estereoscópica y confirme la posición del infundíbulo y la ampulla usando la punta de unas pinzas, o cambiando la posición de la pinza serrafina.
2. Posicione el oviducto cambiando la posición de la pinza serrafina y del ratón.

Nota

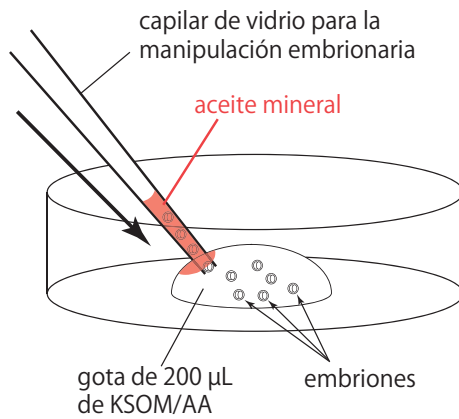
Como los pliegues del oviducto varían entre ratón y ratón, mire detenidamente y ajuste la posición del oviducto para hacer el trabajo más fácil.

Comentario

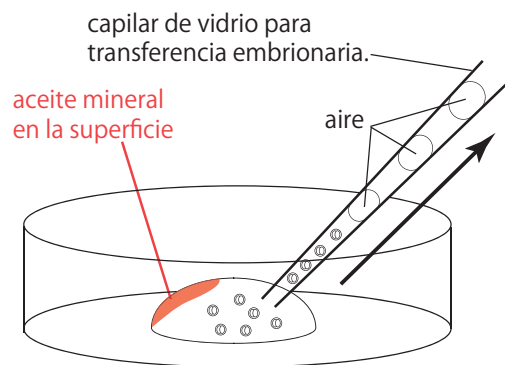
Si usted es zurdo, posicione el oviducto de manera que le sea más fácil realizar el procedimiento con su mano izquierda.

Preparación de los embriones y de los capilares de vidrio

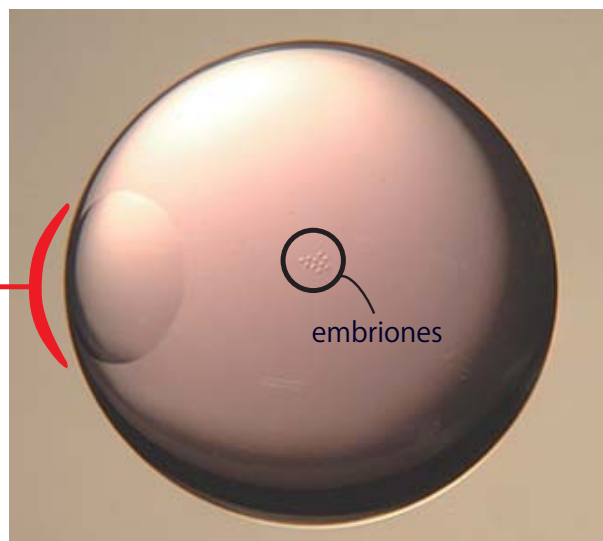
1. Prepare una placa con una gota de 200 μL de KSOM/AA (sin aceite mineral) y ponga 20 embriones en la gota.



2. Para preparar el capilar de vidrio para una transferencia embrionaria aspire aire y medio en intervalos alternados de 2-3 mm cada uno. Coloque diez embriones en el capilar.



aceite mineral en la superficie

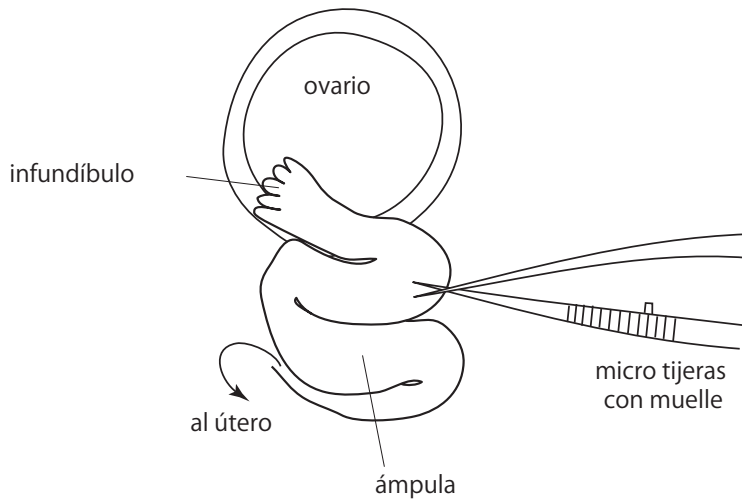


Comentario

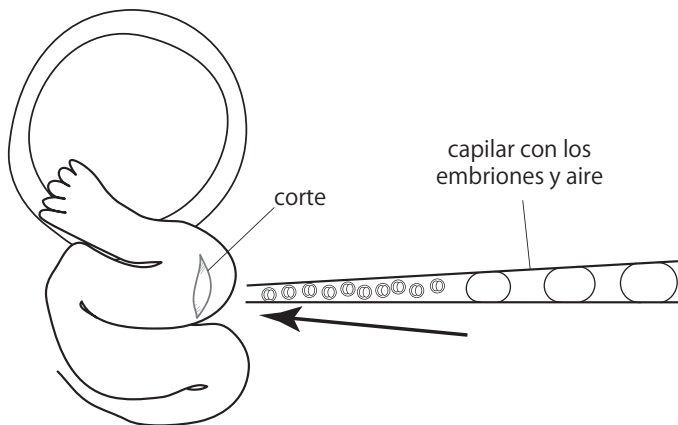
Cuando el capilar de vidrio es introducido en la gota, algo de la aceite mineral quedara en la superficie de la gota tal como se muestra debajo. Los embriones deberán juntarse con la pipeta en el lado opuesto a la mancha en la gota para así evitar aspirar la aceite mineral. Hay evidencias que sugieren que la aceite mineral que pase al oviducto puede provocar efectos adversos en el desarrollo de los embriones a llegar a término.

Transferencia embrionaria

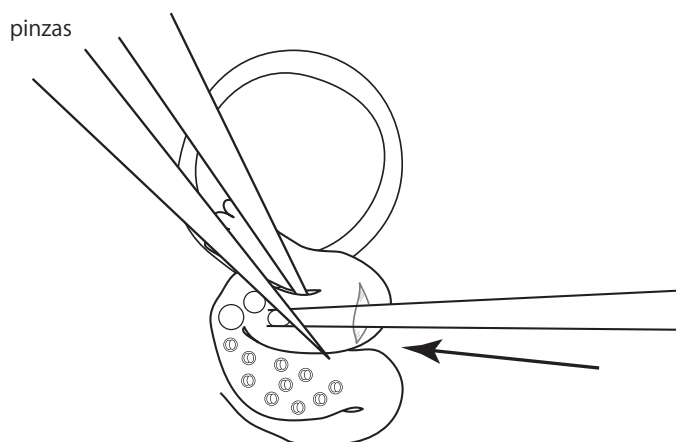
1. Con un par de pinzas de relojero #5 y tijeras de micro-diseccion con muelle diseque la pared del oviducto entre el infundíbulo y la ampúla.



2. Inserte por el corte la punta del capilar que contiene los embriones, luego empuje el capilar dentro del corte hacia la ampúla.



3. Use las pinzas para sostener la parte del oviducto donde se ha insertado el capilar.
4. Libere los embriones y 2-3 gotas de aire dentro de la ampúla.



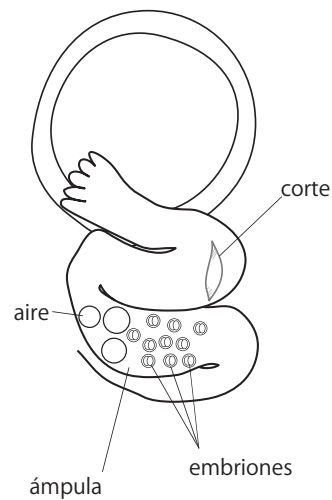
Comentario

Si se ha realizado correctamente, usted podrá observar las burbujas de aire a través de la pared de la ampúla.

Nota

Si usted no puede soltar los embriones y las burbujas de aire en el oviducto, retire un poco el capilar y trate nuevamente.

- Con cuidado retire el capilar del corte.



[Transferencia de embriones en oviducto] No. 17-01



- Empuje el ovario, oviducto y el cuerno uterino hacia dentro del abdomen y cierre la herida usando grapas de sutura.



- Repita el proceso para transferir los 10 embriones restantes en el otro oviducto tal como fue descrito anteriormente.
- Mantenga el ratón sobre una placa térmica a 37°C hasta que se recupere de los efectos de la anestesia.

Referencias

- Nakagata N. 1992. Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice. *Exp. Anim.* 41: 387-388.
- 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.

Nota

Transfiera los embriones luego de ajustar la posición y dirección del oviducto. Si el oviducto está alineado en paralelo al capilar, entonces será más fácil insertarlo dentro del oviducto.

7-3 Transferencia embrionaria en útero

Materiales y equipo

1. Ratón hembra en el 3er día de pseudopreñez (Día 1 es el día en que observo el tapón vaginal)
2. Anestésico
3. Tijeras finas
4. Pinzas de relojero #5
5. Pinza serrafina
6. Aguja 27G
7. Grapa de sutura (Autoclip 9mm; Clay Adams Cat. No. 427631) y aplicador de grapas (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams Cat. No. 427630)
8. Placas plásticas (35 mm X 10 mm Cat. No. 430588; CORNING)
9. Capilares de vidrio para transferencia embrionaria
10. Placa térmica (37°C)

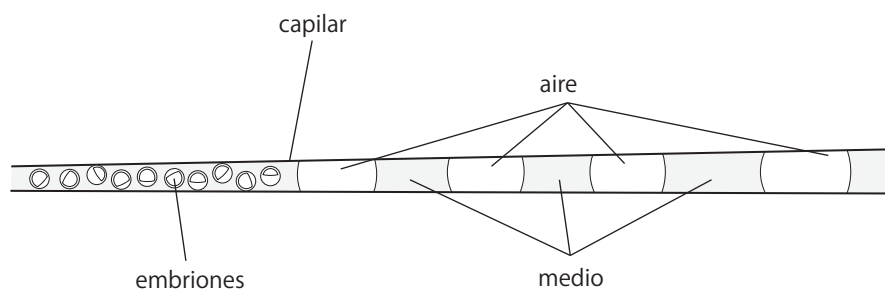
Procedimientos

Transferencia embrionaria

Prepare la receptora, los embriones (en estadio de 8-celulas a blastocisto) y el capilar de vidrio como para el método usado para transferir embriones en oviducto.

(Por favor, consulte al capítulo de transferencia embrionaria en oviducto en la página 67.)

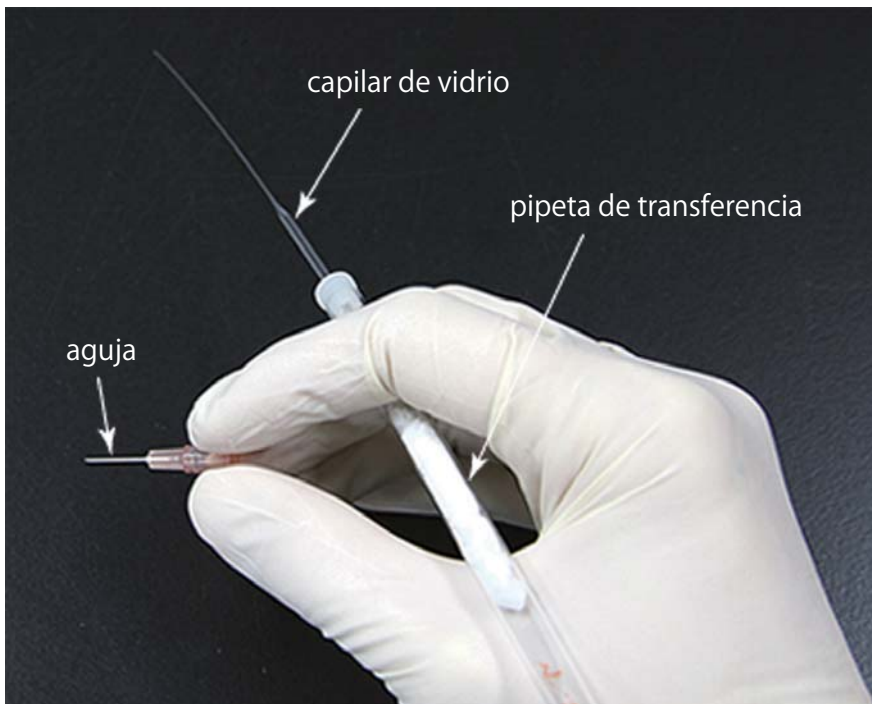
1. Extraiga el ovario, oviducto y parte del cuerno uterino como en el procedimiento convencional.
2. Fije la pinza serrafina en el cumulo graso que está adosado a la bursa ovárica.
3. En preparación para la transferencia embrionaria, aspire en el capilar de vidrio aire y medio alternados y separados por intervalos de 2-3 mm.



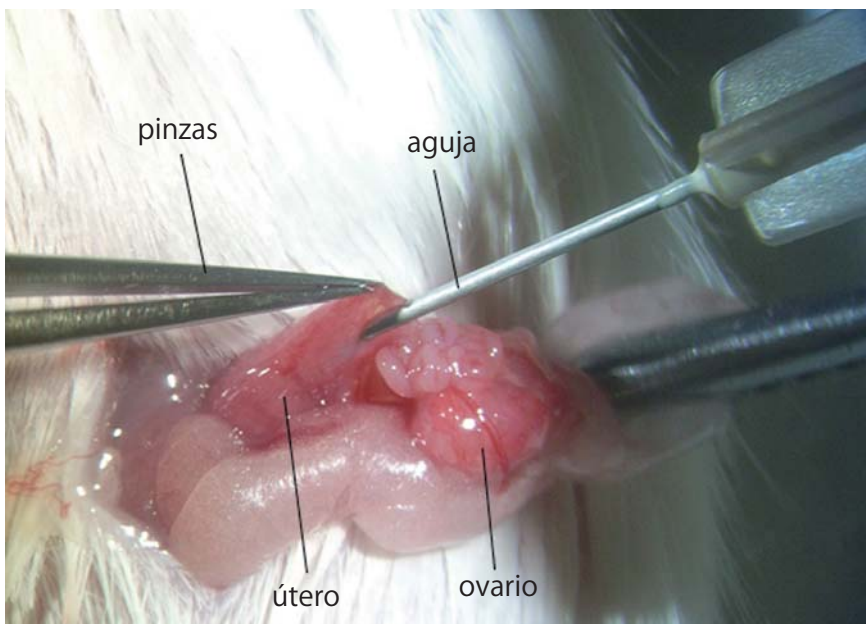
Nota

Cuando prepare el capilar de vidrio, evite dejar el capilar en contacto con el aceite mineral.

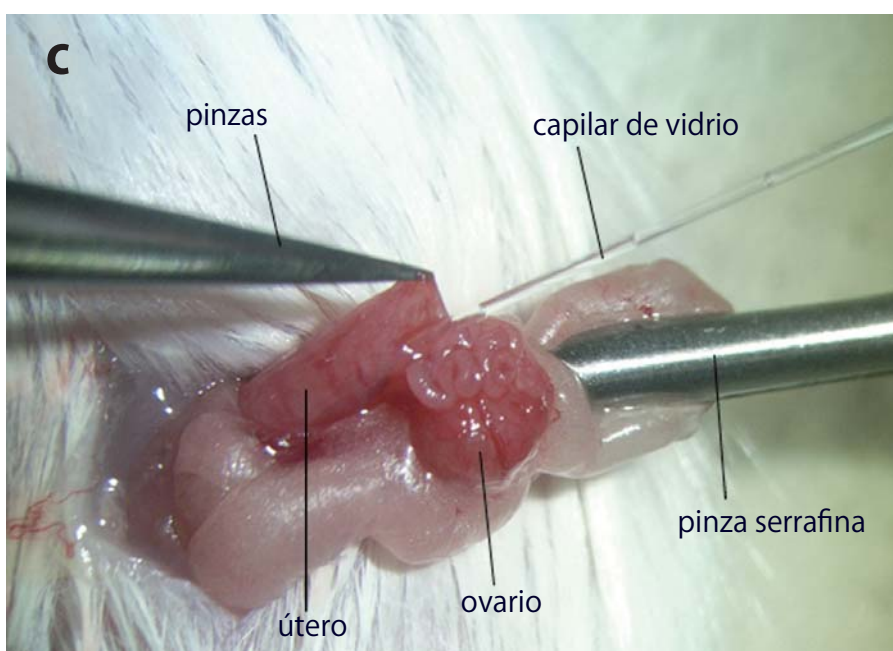
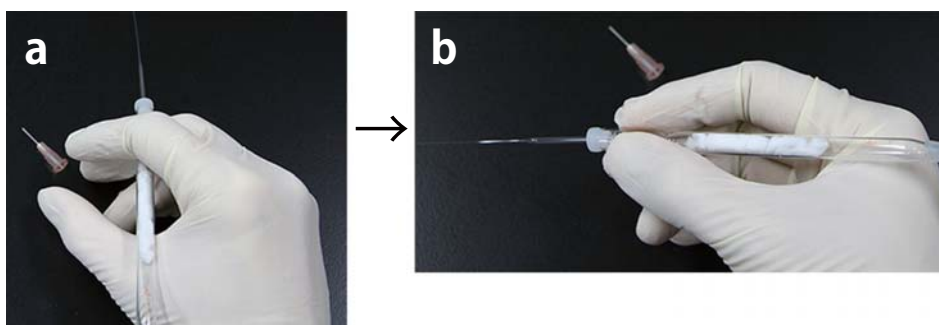
4. Sostenga la aguja de 27G y la pipeta de transferencia como muestra la foto de abajo, simultáneamente observe bajo la lupa estereoscópica ambos, la punta de la aguja y el útero. Asegúrese de mirar a la aguja y el útero simultáneamente bajo la lupa estereoscópica para confirmar la posición de la aguja en relación con el útero.



5. Con cuidado, sostenga la parte superior del cuerno uterino usando unas pinzas finas e inserte la aguja 27G en la pared del útero hacia la cavidad uterina.



- Deje la aguja y sostenga la pipeta de transferencia como lo muestran los diagrama a y b. Inserte la punta del capilar que contiene los embriones y las burbujas de aire profundamente en la cavidad uterina a través del orificio hecho con la aguja, como muestra el diagrama c.



- Libere los embriones en la cavidad uterina junto con 2-3 burbujas de aire.
- Suavemente retire el capilar del orificio.

[Transferencia embrionaria en útero] No. 18-01

[Realizando la operación] No. 18-02

Nota

Usted debe sostener la parte superior del cuerno uterino y seguir observando el orificio hecho con la aguja hasta que la transferencia embrionaria se termine. Si usted aparta la vista del orificio antes de que se complete el procedimiento, puede ser difícil encontrar el nuevamente el sitio del orificio.

Nota

Si usted no puede liberar los embriones y las burbujas de aire en el oviducto, retire un poco el capilar e intente nuevamente.

Nota

Para facilitar mantener la vista en el orificio hecho con la guja usted deberá sostener la aguja y la pipeta de transferencia, ambas en su mano dominante, antes de comenzar el procedimiento.

- Empuje el ovario, oviducto y cuerno uterino dentro del abdomen y cierre la incisión con grapas de sutura.



- Repita el proceso para transferir 10 embriones en el otro cuerno uterino como ha sido descrito anteriormente.
- Mantenga el ratón en una placa térmica a 37°C hasta que se recupere de los efectos de la anestesia.

Referencias

- 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.

7-4 Cesárea y adopción

La cesárea deberá realizarse si la receptora preñada no ha parido las crías para la fecha estimada de parto.

Materiales y equipo

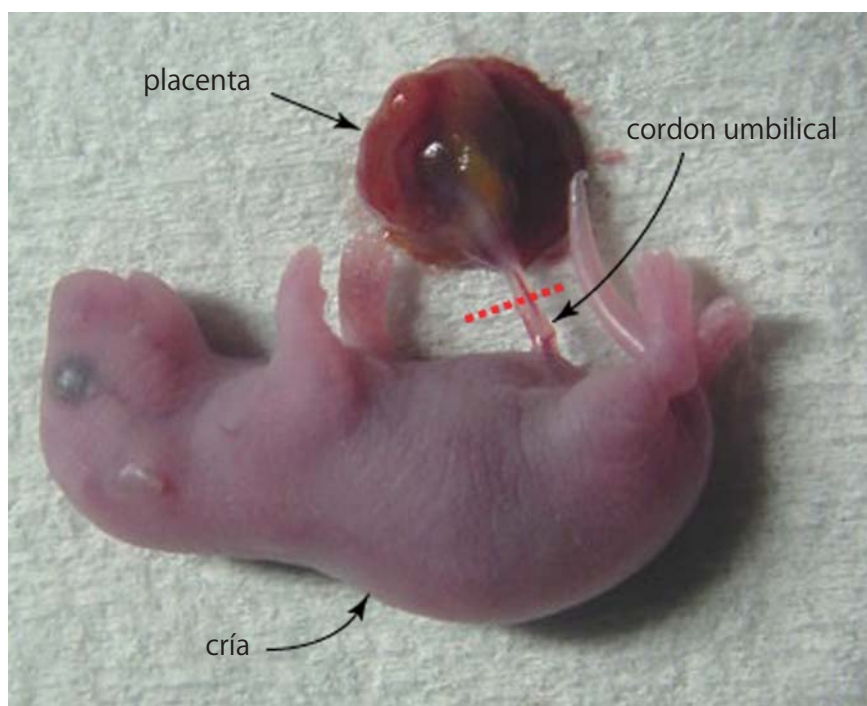
1. Madre nodriza (Una nodriza es una hembra que haya parido el mismo día o el día anterior al día estimado de parto de la hembra preñada.)
2. Tijeras finas
3. Pinzas de relojero #5
4. Placa térmica (37°C)
5. Ratón hembra preñada

Procedimientos

Cesárea

1. Sacrifique la hembra preñada y limpie el abdomen con un algodón embebido en etanol 70%.
2. Abra inmediatamente el abdomen y con una tijeras finas retire el útero con las crías.
3. Coloque el útero sobre un papel absorbente y corte la pared uterina.
4. Rápidamente retire las crías del saco vitelino y del amnios y corte el cordón umbilical.

[Cortando el cordón umbilical]




5. Use pañuelos de papel para limpiar el cuerpo de las crías el fluido amniótico, secreciones y sangre.
6. Coloque las crías sobre una placa térmica a 37°C , suavemente pellizque varias veces la cola de cada una con unas pinzas hasta que comiencen a respirar y se tornen suficientemente rosados.

[Desde la extracción del útero a la primera respiración de las crías] No. 19-01 

Adopción

Seleccione una madre nodriza cuyas crías tengan un color de capa diferente que los nacidos por cesárea, para luego poder distinguir entre ellos.

1. Quite la madre nodriza de la caja.
2. Reduzca el número de crías de la nodriza a la mitad (por ejemplo, si el número de crías de la nodriza es 10, quite 4-5 crías).
3. Frote las crías obtenidas por cesárea y que serán adoptadas (el mismo número de crías que las que se han retirado) con el material de la cama, luego mézclelas con las crías restantes de la nodriza.
4. Ponga la nodriza nuevamente en la caja.

[Adopción] No. 19-02 

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.