

CAPÍTULO II

Biología y manejo reproductivo del ratón

2.1 Biología del ratón

2.1.1 Hábitat

Los denominados ratones caseros (ver Capítulo III por sistemática de los roedores) acompañan al hombre en todos los territorios, desde los desiertos más calurosos hasta las regiones sub-antárticas, a nivel del mar o en los poblados andinos a más de 4000 metros de altitud. En las ciudades, los podemos encontrar virtualmente en todos lados, desde los túneles del desagüe hasta las cámaras frigoríficas, pasando por las bibliotecas. Algunas poblaciones de ratones viven en el campo, donde construyen túneles de diversa arquitectura y complejidad, mientras que otras lo hacen en regiones boscosas, donde encuentran refugio contra los predadores. Sin embargo, la mayoría son **comensales** del hombre, manteniéndose a expensas de sus alimentos o desperdicios y usando sus construcciones (espacios entre paredes, cañerías, conductos de aire, entrepisos etc.) como refugio y fuente de calor. Su tremenda versatilidad les permite trepar paredes, saltar, e inclusive nadar para acceder al lugar deseado. A pesar de esto, el comensalismo no es ni una regla ni una obligación para el ratón, ya que se conocen islas en el norte de Escocia que fueron abandonadas por el hombre pero no por estos pequeños roedores. Se conocen también algunas regiones del sur de Europa donde los ratones viven en el campo durante el verano y entran a las casas en el invierno.

La gran adaptabilidad del ratón a todo tipo de ambientes y situaciones ha atraído la atención de los etólogos, quienes consideran a estas especies como las más adaptables —en particular en términos reproductivos— de todos los mamíferos, con excepción del hombre. En la mayoría de las especies, la adaptación a un nuevo ambiente es un proceso muy lento, ligado a la selección natural y por lo tanto a la carga genética. Parecería ser que en los ratones esa ajustada ligadura entre comportamiento y genética se hubiese relajado.

2.1.2 Comportamiento

Los ratones son animales de actividad esencialmente nocturna y por lo tanto su vista está muy poco desarrollada, de hecho, muchas de las líneas de laboratorio son ciegas o tienen una visión borrosa, sin que por ello se vean perturbadas sus actividades. Los sentidos más importantes para los ratones son, por lo tanto, el olfato y el tacto. En la orina del macho, y en menor grado de la hembra, existen compuestos odoríferos muy fuertes que sirven para marcar el territorio y regular la actividad sexual y social del grupo (ver Capítulo V). El oído de los ratones también está muy desarrollado, especialmente para frecuencias altas (ultrasonidos) que los humanos no podemos percibir. Por ejemplo, los roedores pueden oír sonidos de frecuencias tan altas como 70-80 kilohertz, aunque son insensibles a frecuencias de menos de 500 hertz.

Con respecto a la agresividad, los ratones no son espontáneamente agresivos frente a las otras especies con las cuales convive (incluido el hombre), siendo la huida su reacción más común. Por el contrario, cuando se trata de otros ratones, la reacción de defensa del territorio y de caza del intruso es muy característica, especialmente en los machos. La pelea consiste en morder al adversario en el morro o en la base de la cola. Entre los machos, existe una competencia muy fuerte por la reproducción. En todos los grupos hay machos dominantes que tienen a su cargo un grupo de hembras, lo que constituye una unidad de reproducción relativamente consanguínea (en promedio, dos machos y seis hembras) cuya composición puede cambiar a lo largo del tiempo. La expectativa de vida de los ratones en medios naturales no excede, en general, de un año, aunque las líneas de laboratorio pueden vivir algo más de dos años (algunos híbridos F1 pueden pasar los tres años).

Los ratones caseros son animales donde el tubo digestivo, relativamente largo, está adaptado a una alimentación preferentemente vegetal (en particular semillas) y por lo tanto rica en celulosa y lignina. Sin embargo, los ratones pueden comer prácticamente de todo, desde insectos (inclusive sus larvas) hasta raíces. El ratón posee un ciego enorme con una flora bacteriana que asegura la digestión (lisis) de la celulosa y la síntesis de vitaminas hidrosolubles. El estómago del ratón (al igual que el de la rata) tiene la particularidad anatómica de estar dividido en una porción glandular y otra muscular (o no glandular). Además, los ratones caseros pueden adaptarse fácilmente a la falta de agua consumiendo vegetales y concentrando su orina. Sus dientes delanteros (incisivos), como en todos los roedores, crecen en forma continua y deben ser gastados por el uso. Se calcula que un incisivo de ratón puede crecer hasta cinco centímetros por año. Por lo tanto, estos animales presentan la necesidad imperiosa de roer (de allí el nombre de roedores) toda clase de objetos (no sólo los alimentos), lo que los convierte en animales devastadores.

2.1.3 Reproducción

2.1.3.1 Maduración sexual y ciclo estral

Las hembras portan en sus ovarios (ya antes de nacer) miles de células germinales primordiales (**ovogonias**) las cuales quedan detenidas en la profase de la primera división meiótica. Las ovogonias están rodeadas de capas celulares que, en conjunto, se denominan **foliculos primordiales** o primarios. Al llegar a la pubertad, los ovarios (con alrededor de 3000 foliculos primarios cada uno) se activan por la estimulación hormonal y (cada 4-5 días) un grupo de ovogonias sigue su desarrollo para formar los **oocitos** (u **ovocitos**) (del inglés *oocytes*). (También se usan términos más genéricos como **óvulos** o **huevos no fertilizados**, del inglés *unfertilized eggs*.) Sin embargo, la gran mayoría de los oocitos —la célula más grande entre los mamíferos con alrededor de 80 micrones de diámetro en el ratón— nunca llegará a la ovulación. Luego de la ovulación, las células del foliculo ovárico se luteinizan, lo que origina la transformación del foliculo ovárico en **cuerpo lúteo**. Justo antes de la liberación del ovocito se completa la primera división meiótica y se forma el **primer cuerpo polar**. La segunda división

meiótica empieza inmediatamente después, pero se detiene en la metafase. Los óvulos permanecen viables por 10-15 horas luego de la ovulación y en el caso de que se produzca la fertilización se induce la terminación de la segunda división meiótica, lo que genera el **segundo cuerpo polar**. (En términos estrictos, las células germinales femeninas no son en ningún momento haploides, ya que expulsan el segundo cuerpo polar en el momento en que reciben el grupo haploide de cromosomas proveniente del espermatozoide).

Las hembras en estado salvaje son capaces de reproducirse, como lo más temprano, a partir de las seis semanas de vida; aunque en el laboratorio, lo mismo que en los países fríos, la madurez sexual está un poco retrasada (7-8 semanas). La vida sexual de las hembras se prolonga hasta una edad muy avanzada (13 a 14 meses de vida) y las camadas se suceden una tras otra (al menos durante los primeros meses) a un ritmo de una cada tres o cuatro semanas. El **ciclo estral** (proestro, estro, metaestro y diestro) dura de 4 a 6 días con un **estro** (o celo) de aproximadamente 8-12 horas. Durante el estro, las hembras están receptivas y aceptan la monta del macho. Otro rasgo particular de las hembras, es la capacidad de entrar en estro dentro de las 24 horas posteriores al parto. Este fenómeno se conoce como **estro posparto** y permite a la hembra quedar preñada inmediatamente, aumentando su ya enorme prolificidad.

Los machos de la mayoría de las líneas de ratones de laboratorio son púberes (con actividad espermática establecida) entre 6 y 8 semanas y mantienen la fertilidad prácticamente toda la vida. Las células germinales masculinas se diferencian en los túbulos seminíferos a lo largo de toda la vida de un animal normal adulto. Esta diferenciación, que abarca desde las células primordiales (denominadas **espermatogonias**) hasta los espermatozoides, se denomina **espermatogénesis**; tardando alrededor de 13 semanas para que una espermatogonia produzca alrededor de 120 espermatozoides. Luego, los espermatozoides maduran pasando por el epidídimo y realizan la **capacitación** al entrar en contacto con el tracto reproductivo femenino (tras la monta).

2.1.3.2 Comportamiento sexual en las poblaciones salvajes

La estructura poblacional más característica de los ratones en estado salvaje es la de un pequeño harén o familia (en inglés, *deme*), llevada por un macho dominante que controla un territorio determinado. El harén puede estar formado hasta por 10 hembras y sus crías, las cuales son reconocidas y atendidas por el macho dominante. En cambio, el macho eliminará a todas aquellas crías que pertenezcan a una hembra ajena a su harén. Como consecuencia de esta territorialidad, el nivel de migración entre familias es muy bajo, aun viviendo a pocos metros de distancia. En condiciones salvajes (en particular en climas adversos), la reproducción de los ratones tiende a ser estacional (primavera-verano). Sólo bajo condiciones ideales, con exceso de alimento y clima favorable, los ratones comensales pueden reproducirse todo el año.

2.1.3.3 Apareamiento, preñez y amamantamiento

Los eventos más importantes de la vida sexual del ratón ocurren durante la noche, o el correspondiente período de oscuridad dentro de los ciclos de luz programados en el animalario. La monta puede variar en duración de 10 minutos hasta casi una hora, siendo un rasgo espe-

cífico de cada línea consanguínea. Por ejemplo, los machos de la línea DBA son rápidos y los machos BALB/c son más lentos. La cuenta espermática se recupera recién a los dos días, aunque algunos machos de líneas no consanguíneas pueden copular (y preñar) hasta tres hembras en una sola noche. Por lo dicho anteriormente, está recomendado dejar descansar a los machos por lo menos tres días entre montas.

En los ratones el esperma del macho coagula dentro de la vagina bajo la forma de un “**tapón vaginal**” relativamente duro (semejante a miga de pan masticada), que persiste unas 6 a 12 horas. Este tapón está formado por una mezcla de secreciones de las glándulas sexuales accesorias del macho y secreciones vaginales. Debido a este tapón vaginal (a diferencia de otros mamíferos), la hembra del ratón puede ser fecundada sólo por un macho. La presencia del tapón vaginal es un detalle de manejo esencial para los trabajos que requieran la confirmación (y el cálculo del tiempo) de la preñez, por lo cual es recomendable controlar las hembras bien temprano a la mañana siguiente de la monta. A modo de ejemplo, los investigadores que trabajan sobre el desarrollo embrionario necesitan saber con mucha precisión el momento de la concepción para calcular cuándo extraer los embriones. La palpación de los fetos es posible solamente a partir del día 12 de preñez, en particular en las hembras múltiparas, y el aumento de peso se hace evidente recién desde los días 12-14 de preñez, dependiendo de las líneas.

La fertilización ocurre en la parte superior del oviducto (ámpula) y al día 5 el embrión (estado de **blastocito** o **blastocisto**) se implanta en la pared del útero. La gestación dura entre 18,5 y 19,5 días en las hembras **primíparas**, y entre 19 y 21 en las **múltiparas**, dependiendo del estado fisiológico y la constitución genética de la hembra y del número de crías que esté gestando. Un rasgo interesante de la hembra del ratón es que es una de las pocas hembras de mamífero que puede quedar preñada mientras está amamantando. En este caso, la implantación de los blastocitos en el útero sufre un retardo, alargando la gestación hasta una semana.

Cuando una hembra preñada entra en contacto con un macho genéticamente distinto (en el caso del animalario, un macho de otra línea consanguínea) dentro de los primeros días de gestación, existe la posibilidad de que detenga la preñez en forma prematura. Este fenómeno de bloqueo hormonal estaría relacionado a la preferencia por la variabilidad genética (ver Capítulo V) y se designa **efecto Bruce**. De este fenómeno se desprende el consejo de no poner a una hembra preñada en contacto con machos (ni cama contaminada con orina) de otras líneas por lo menos durante los primeros cinco días después de la monta.

El ratón es una especie **politoca** (ovulación múltiple) y por lo tanto porta varios fetos en la misma gestación. El eventual aborto de uno de los fetos no impide la llegada a término de los otros; lo que constituye una ventaja evolutiva (y es conveniente para los estudios del desarrollo embrionario). Los diferentes estadios del desarrollo embrionario han sido estudiados en detalle y existen manuales de embriología que ilustran, día por día, las etapas del desarrollo intrauterino (**Figura 2.1**). Para más detalles, consultar los libros de Theiler (1989), Rugh (1990), Kaufman (1992) y Hogan y colaboradores (1994). Los aspectos básicos de la manipulación genética de los embriones serán vistos en el capítulo VIII.

El ratón hembra, que es una madre excepcional, se ocupa en forma meticulosa de las crías, desde el parto hasta el destete. Apenas nacidas las crías (faltas de pelo y con los ojos cerrados) la madre devora la placenta y el cordón umbilical, lame los pequeños hasta que comienzan a respirar y los coloca en el nido (cuidadosamente preparado); luego expulsa el próximo feto, del cual se ocupará con la misma dedicación. Hay que considerar que también puede ocurrir que la hembra abandone las crías por falta de estímulo para la lactación, o que incluso se las coma (canibalismo). Todo el proceso del parto puede durar hasta dos horas. Los rato-

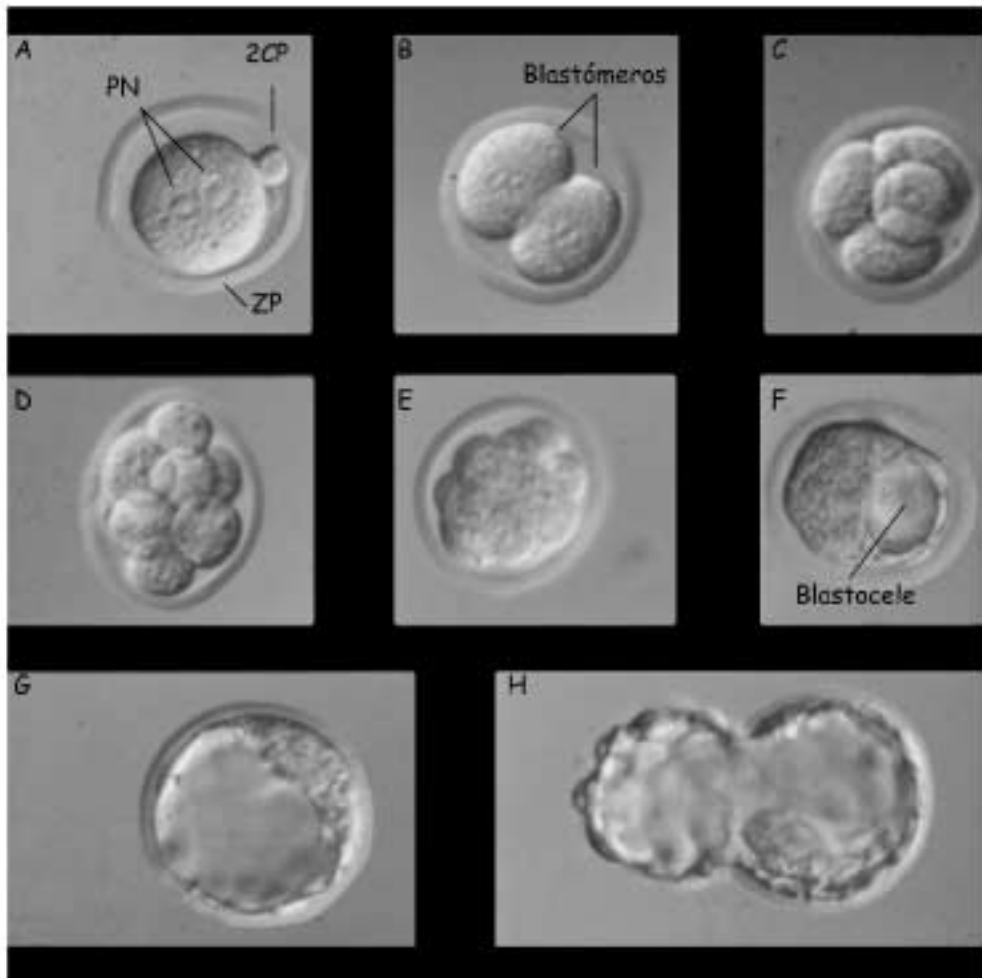


Figura 2.1. Desarrollo embrionario en el ratón. **A:** Embrión unicelular, 0-1 día post-coito (p.c.). Observar el segundo corpúsculo polar (2CP), los pronúcleos (PN) y la zona pelúcida (ZP). **B:** Embrión de 2 células, 1 día p.c. (momento de elección para los trasplantes embrionarios). **C:** Embrión de 4 células, 2 días p.c. **D:** Embrión de 8 células, 2 días p.c. **E:** Mórula, 3 días p.c. **F:** Blastocito temprano, 3,5 días p.c. (observar la cavidad llamada blastocelo). **G:** Blastocito expandido (aún con zona pelúcida), 4 días p.c. **H:** Blastocito eclosionando (*hatching*), 4 días p.c. Fotos gentileza del Dr. Charles Babinet, *Biologie du Développement, Institut Pasteur*, París, Francia.

nes paren en general entre 4 y 8 crías, pero no es raro que en el laboratorio den a luz sólo un par de crías. En el caso de algunos grupos de ratones exocriados, el número de crías puede oscilar entre 12 y 14, con un récord de 32 crías para una hembra del grupo de ratones Swiss (ICR). Recordar que el promedio de crías en la camada es un rasgo que depende fundamentalmente de la constitución genética de la madre.

El **rendimiento reproductivo** (en inglés *breeding performance*) de las diferentes líneas y grupos (*stocks*) de ratones de laboratorio suele medirse por los siguientes parámetros: (i) edad del primer apareamiento, (ii) número de apareamientos fértiles, (iii) número total de camadas durante la vida reproductiva, (iv) promedio de crías por camada, y (v) número de crías destetadas.

La **Tabla 2.1** muestra las características reproductivas de las líneas consanguíneas más populares. Multiplicando el número de apareamientos fértiles por el número total de camadas y el promedio de crías por camada, se obtiene una **tasa de fecundidad**. A la cabeza de este “*ranking*” encontramos a la línea FVB/N, lo que explica, sólo en parte, su elección como línea para generar ratones transgénicos (como veremos en el Capítulo VIII, el gran tamaño de los pronúcleos también facilita el procedimiento), y en el otro extremo (dentro de las líneas estándar) tenemos la línea BALB/cJ. Muchos responsables del manejo reproductivo en animalarios de ratas y ratones prefieren hablar simplemente del número de crías por hembra y por semana. En el ratón, este valor va de 0,1 a 2,5 crías/hembra/semana; por ejemplo, en el caso de la línea C57BL/6 es de 0,6 crías/hembra/semana.

La lactancia dura entre 19 y 21 días y las crías comparten de modo “democrático” las mamas disponibles (cinco pares: tres torácicas y dos abdominales). No es raro observar que dos madres alternen sus servicios de cuidado y amamantamiento en un nido común. En particular, la

Línea	Apareamientos Productivos	Primera monta (en semanas)	Promedio de crías	Total de camadas	Fecundidad Relativa
129X1/SvJ	75%	7.9	5.9	4.1	18.1
A/J	85%	7.6	6.3	2.9	11.9
AKR/J	84%	6.6	6.1	2.2	11.3
BALB/cJ	47%	8.0	5.2	3.8	9.3
C3H/HeJ	86%	6.7	5.7	2.9	14.2
C57BL/6J	84%	6.8	7.0	4.0	23.5
C57BL/10J	67%	7.7	6.3	2.8	11.8
CBA/CaJ	96%	6.4	8.9	2.7	17.9
DBA/2J	75%	7.4	5.4	3.9	15.8
FVB/N	>90%	-	9.5	4.8	41.0
SJL/J	72%	7.4	6.0	3.1	13.4

Tabla 2.1. Características reproductivas de algunas líneas consanguíneas estándar de ratones: Se considera apareamiento productivo siempre que nazca al menos una cría. La fecundidad relativa se calcula de la siguiente manera (% apareamientos productivos) X (promedio de crías) X (total de camadas). El valor obtenido es una medida general de la fecundidad de la cepa. Adaptado de Silver L. M. (ed.) *Mouse Genetics. Concepts and applications*. Oxford University Press. Oxford, 1995.

leche de estos roedores es muy rica en grasas y con porcentajes más bajos de agua que la leche de otros mamíferos. Durante los primeros días, en cuanto la madre abandona el nido para alimentarse, las crías comienzan a enfriarse ya que –sin pelaje e inmaduros– no son capaces de regular la temperatura e inmediatamente comienzan a llamar usando sonidos ultrasónicos. A partir del día 14 de vida, las crías, ya con pelaje completo y los ojos abiertos, abandonan el nido y comienzan a explorar, mientras la madre y el padre los toman por la piel del cuello para devolverlos al nido. Alrededor de los 16 días de vida, el amamantamiento se convierte en facultativo y las crías comienzan a alimentarse por sí mismas, ingiriendo alimentos sólidos por primera vez (Figura 2.2).

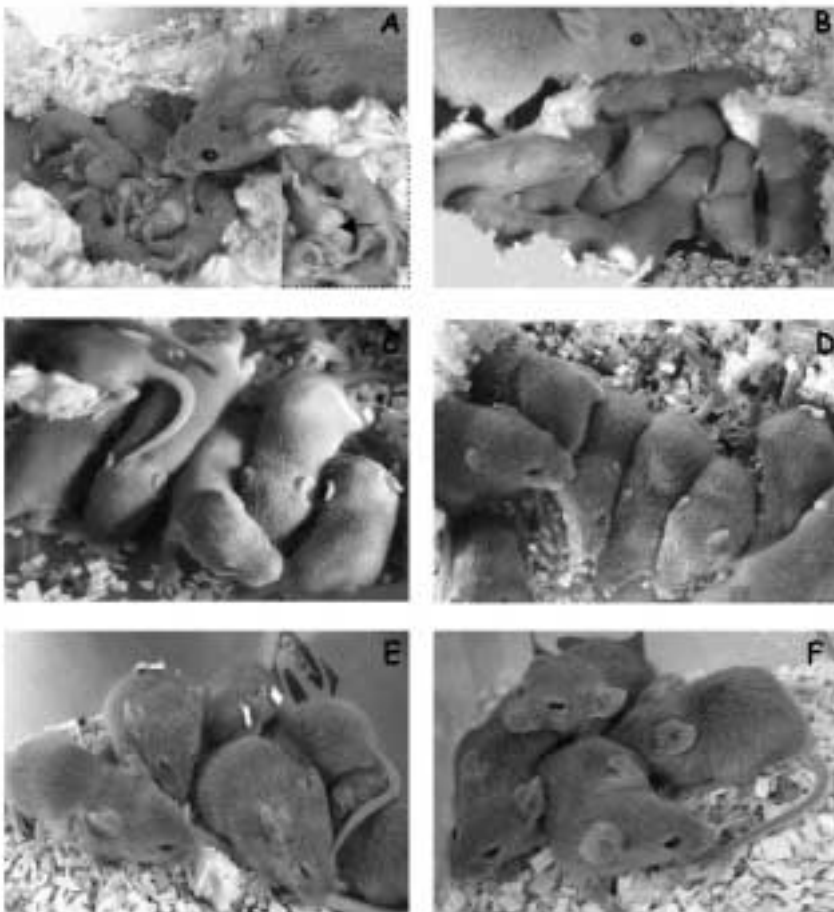


Figura 2.2. Desarrollo postparto. La foto A muestra una camada de ratones en su nido al día 1 post-parto: notar la ausencia de pelo, los ojos y las orejas cerradas. En el recuadro se puede observar la leche en el estómago a través de la piel (flecha). A la derecha (B) las mismas crías al día 6 post-parto, momento en que comienza a crecer el pelaje. Los mismos ratones al día 10 (C) notar los ojos aún cerrados, y 14 (D), cuando comienzan a abrir los ojos y salir del nido. Abajo, la misma camada al día 17 (E) y 21 post-parto (F). Fotos: F. Benavides. The University of Texas - M.D. Anderson Cancer Center, Department of Carcinogenesis - Science Park, Texas, Estados Unidos.

Esta pequeña reseña de la biología del ratón servirá para interpretar muchas de las medidas del manejo reproductivo, tanto como las relacionadas al macro y microambiente en los animalarios. Para más información sobre la biología del ratón, consultar los siguientes libros: *Biology of the Laboratory Mouse* (1975), *The Mouse in Biomedical Research* Vol. 1 (1981) y Vol. 2 (1982) y *Mouse Genetics: Concepts and Applications* (1995).

2.2 Manejo reproductivo del ratón en el animalario

2.2.1 Generalidades

En las condiciones del animalario, las hembras de ratón son usadas como reproductoras entre las 6-8 semanas y los 8-10 meses de vida, dependiendo de las líneas y genotipos. La vida reproductiva útil de los machos es un poco más extensa. Sabiendo que la duración del ciclo estral en las hembras es de 4-5 días podemos inferir que, en un momento determinado al azar, una de cada cuatro hembras estará en celo, y por lo tanto receptiva para la cópula. En un animalario con un ciclo de luz/oscuridad estándar (12 horas luz/12 horas oscuridad), el celo se produce generalmente luego de la medianoche.

Normalmente se usan tres tipos de planteles reproductivos: las parejas, los tríos y el harén. Las parejas pueden ser de por vida (monogámicas), los tríos están formados por un macho y dos hembras y el harén consiste en un macho con dos ó más hembras. En el caso de machos transgénicos (o mutantes), donde queremos propagar el genotipo, o durante el desarrollo de líneas congénicas, se suele rotar al macho una vez por semana (mínimo 4 días) con distintas hembras (generalmente en tríos) para optimizar la reproducción. Se aconseja dejar al macho en su jaula y rotar las hembras. Como regla general, no es aconsejable colocar más de un macho en la misma jaula con fines reproductivos, ya que normalmente se pelean por razones de dominio territorial.

En la circunstancia de necesitar acoplamientos programados, es recomendable sacar provecho del denominado **efecto Whitten**: cuando un grupo de hembras se pone en contacto con un macho (o su olor) su ciclo estral se sincroniza y la mayoría estará receptiva al tercer día. Este fenómeno permite programar mejor el día del acoplamiento: se coloca el macho en un compartimento aislado (dentro de la jaula de las hembras) en el día preseleccionado; al tercer día se libera al macho y, muy probablemente, se producirá algún acoplamiento. En todos los casos, es esencial seguir una identificación precisa de los animales, una prolija descripción de los pedigríes y registros de acoplamiento detallados. Para dicho propósito existen varios programas de computación que ayudan enormemente en estas tareas. Entre ellos: *Colony* y *Facility* (<http://www.locusttechnology.com/>), *Gene-Track* (<http://www.gcsinc.com>), *Mendel's Lab 4.1.4* (*Mendel's Software*), *Progeny* (<http://www.progeny2000.com/>), y *BigBench Mouse* (<http://www.big-benchsoftware.com/>).

El amamantamiento es un acto esencial, ya que de la cantidad y calidad de la leche materna depende el crecimiento de las crías. Los recién nacidos comienzan a mamar inmediatamente

después del parto y podemos evaluar este hecho por la visualización de la leche en el estómago, a través de la delgada piel de los neonatos. En muchas circunstancias, es importante considerar la posibilidad de usar madres sustitutas que puedan amamantar a crías ajenas; por ejemplo cuando una hembra transgénica produce poca leche o su comportamiento materno se encuentra alterado. Para esta función se elige generalmente una hembra multipara de un *stock* de ratones exocriados (ya que son muy buenas madres) que venga de parir. Para tal propósito, se retira la camada propia y se la pone en un lugar limpio donde se la mezcla con aquellas crías ajenas que queremos amamantar. Se aconseja dejar un número total de crías razonable y, dentro de lo posible, usar el color del pelaje para distinguir el origen de las crías. Las crías pueden destetarse tan temprano como al día 18 de vida, aunque el manejo estándar es hacerlo alrededor de las tres semanas. En el caso de animales mutantes o inmunosuprimidos, es aconsejable extender el período de amamantamiento hasta las cuatro semanas.

La determinación del sexo de los animales (**sexado**) se realiza por simple observación de la zona perianal a partir de las tres semanas (antes de la tercera semana es más difícil y requiere más experiencia). Para dicho propósito se evalúa la distancia entre la **papila genital** y la apertura anal, la cual es casi el doble en los machos (**Figura 2.3**). El tamaño de la papila genital es también ligeramente mayor en los machos. Como una alternativa, es posible observar la parte ventral de las crías, entre los días 9 y 15, y distinguir a las hembras por la falta de pelo alrededor de los pezones. (También es posible observar una pequeña mancha negra en el escroto de los machos pigmentados desde el primer día de vida).

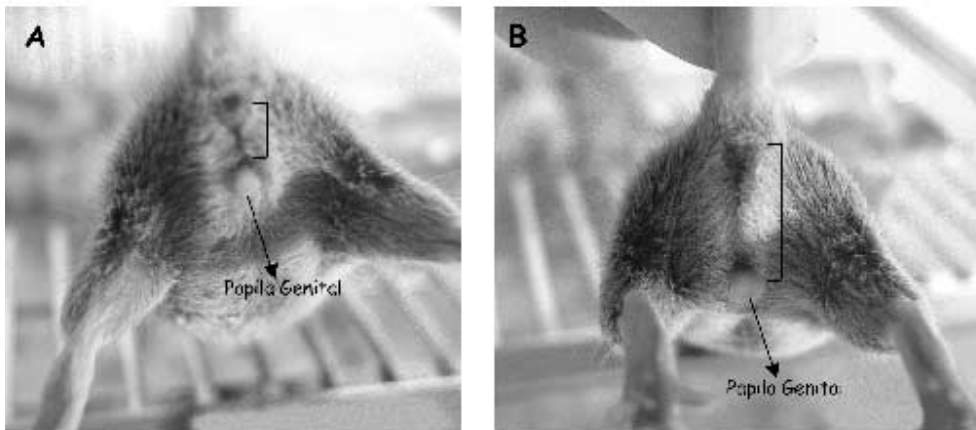


Figura 2.3. Sexado de los ratones. La foto A muestra un ratón hembra al mes de vida; a la derecha (B) un macho de la misma camada. Como puede observarse, la distancia ano-genital en los machos es aproximadamente el doble que en las hembras. Además, la papila genital (flecha) es más prominente en los machos, lo que facilita el sexado en los animales adultos. Fotos: F. Benavides. The University of Texas - M.D. Anderson Cancer Center, Department of Carcinogenesis - Science Park, Texas, Estados Unidos.

Con respecto a la **identificación** (o **marcaje**) de ratones (y otros roedores de laboratorio) daremos sólo una breve reseña de los métodos de identificación permanentes. Las muescas en las orejas (en inglés, *ear notching*) es uno de los métodos de uso más extendido. Se realiza por medio de sacabocados diseñados para tal propósito siguiendo un código predeterminado por el laboratorio, lo que permite la identificación de los animales en forma muy eficiente. Este sistema es de fácil lectura y no requiere de la sedación de los animales ya que, bien ejecutado, es poco traumático¹. A pesar de ser muy usado en ratas y ratones, este método no se recomienda para hámsters y cobayos debido a que suelen desfigurar las marcas a causa de peleas o del excesivo acicalamiento (en inglés, *grooming*). Los tatuajes permanentes (con tinta) suelen realizarse en las orejas o en la cola, ya sea con pinzas metálicas o con lápices electrónicos. Las tintas más usadas son la tinta india (color negro), el óxido de cromo (color verde) y el ácido pícrico (amarillo). Las amputaciones de dedos se utilizan especialmente para marcar ratones recién nacidos, pero su uso está desaconsejado por ser un sistema más traumático que el marcado de orejas y por llevar más tiempo (en el caso de optar por este sistema, se recomienda hacerlo con anestesia).

La aplicación de **grapas metálicas** numeradas es otra posibilidad, pero se corre el riesgo de que se pierdan o se infecten. Finalmente, los **microchips** implantados en forma subcutánea están ganando mucho terreno por ser fáciles de instalar (además de no provocar reacciones de rechazo) y de lectura rápida (gracias al uso de lectores digitales); aunque su costo es superior a los otros métodos.

2.2.2 Sistemas de cría

Para el mantenimiento de *stocks* de ratones exocriados (no consanguíneos) es necesario establecer sistemas de cruce especiales que eviten el aumento de los niveles de consanguinidad en el grupo. Entre los sistemas más usados se encuentra el método ideado por Poiley en 1960. Este sistema intenta, por medio de cruces en rotación, copiar los apareamientos al azar que se presentan en las poblaciones naturales, y de esta manera mantener la variabilidad dentro de la colonia.

En cambio, para realizar una endocría que dirija al desarrollo de una línea consanguínea, debemos seguir rigurosos cruces hermano con hermana durante más de 20 generaciones. Como veremos en detalle en el Capítulo IV, este esquema reproductivo aumenta el grado de homocigosis y genera animales genéticamente idénticos (**isogénicos**). Los sistemas monogámicos son los más indicados ya que aumenta el rendimiento reproductivo de las hembras. Para el mantenimiento de líneas consanguíneas ya establecidas se recomienda un sistema basado en un **núcleo reproductor** (*foundation stock colony*) y una **colonia de multiplicación** o **expansión**

¹ Es interesante notar que la línea de ratones MRL/Mp posee la capacidad de regenerar el tejido en el espacio dejado por la muesca, sin dejar cicatriz, lo que la convierte en un interesante modelo de regeneración tisular.

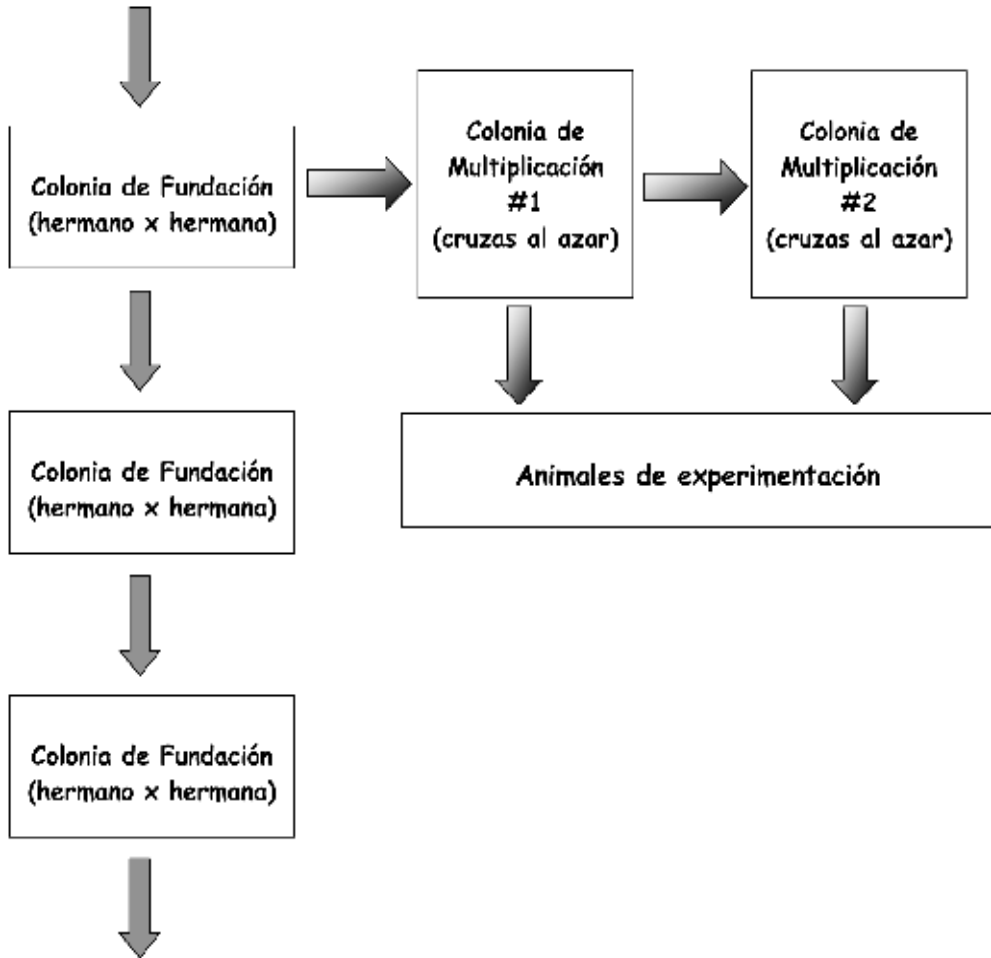


Figura 2.4. Sistemas de cría. El esquema muestra como se puede producir (multiplicar) un gran número de ratones a partir de una colonia de fundación de una línea consanguínea. Para Mantener la consanguinidad dentro del núcleo de fundación se debe hacer estrictamente cruza hermano x hermana. Para la producción de ratones de experimentación es aceptable realizar algunas generaciones de cruza al azar en las colonias de multiplicación, debido a que estos animales no contribuyen con el mantenimiento a largo plazo de la cepa.

(multiplication colony). La **Figura 2.4** muestra en forma esquemática como funciona este sistema. El núcleo de reproducción es lo más valioso debido a que es la fuente de animales puros, genéticamente controlados. Para tal propósito se realizan controles de calidad en forma periódica (ver Capítulo IV) y se los mantiene aislados del resto del animalario (los aisladores son muy útiles para este fin). Este núcleo de reproducción está formado normalmente por un número de parejas monogámicas que oscila entre 10 y 50.

2.2.3 Sistemas de reproducción asistida

2.2.3.1 Inseminación artificial (IA)

Esta técnica no está demasiado explotada en los animalarios que crían roedores de laboratorio. No obstante, es extensamente empleada en la industria ganadera, en el seno de la cual fue desarrollada en la década de 1960. Una de las principales desventajas en el ratón, es el hecho de tener que sacrificar al macho para la obtención del esperma, debido a que se lo recupera del epidídimo y los vasos deferentes. Aunque existe la posibilidad de recuperar espermia eyaculado del tracto reproductivo de una hembra, por distintas razones no es la variante más usada. Otra razón histórica del poco desarrollo de la IA en los animalarios es el hecho de que el transporte de ratones (inclusive embriones) entre institutos es muy accesible. Una vez más, la presencia de una línea transgénica con problemas reproductivos puede llevarnos a hacer uso de esta alternativa. Un ejemplo sería el caso de un macho que no puede realizar la monta por problemas motores o de comportamiento. En particular, el último caso se presenta cuando se intenta cruzar ratones pertenecientes a especies distantes del género *Mus* (ver Capítulo III).

Clásicamente, existen dos alternativas para la técnica de IA: la inseminación por vía vaginal y la inseminación por vía uterina. La primera requiere del uso de otoscopios, espéculos y un número elevado de espermatozoides (más de 3×10^6) mientras que la segunda se realiza por medio de una laparotomía y no necesita un número tan elevado de espermatozoides. También se han descrito técnicas de IA con transferencia del esperma dentro del oviducto, usando un procedimiento quirúrgico similar al utilizado en la transferencia de embriones. Con respecto a las hembras, se recomienda emplear híbridos F1 o ratones exocriados (por sus mayores índices de fertilidad), previamente expuestos a un protocolo de superovulación. El momento ideal para la inseminación es el comienzo del estro. Acto seguido se recomienda poner a la hembra inseminada con un macho estéril (**vasectomizado**), esto lleva a la hembra a un estado de **pseudopreñez** que favorece la implantación del embrión. En el caso del método transvaginal, no se debe colocar al macho estéril con la hembra antes de la inseminación porque el tapón vaginal impediría el procedimiento.

2.2.3.2 Transplante de ovarios

En aquellas situaciones donde una hembra mutante (o transgénica) es potencialmente fértil (en el sentido de que produce oocitos viables) pero por alguna razón no logra llevar la preñez a término, el transplante de ovarios es una opción apropiada. Algunas mutaciones clásicas del ratón, como *obese* y *dwarf*, fueron históricamente mantenidas de esta forma. La técnica consiste en la ablación quirúrgica de los ovarios de la hembra incapaz y el transplante de los mismos dentro de la bolsa ovárica de una hembra receptora (a la cual se le extrajo sus propios ovarios). Es recomendable usar una hembra receptora con un color de pelaje diferente al de la hembra dadora de los ovarios, para poder diferenciar las posibles crías nacidas de tejido ovárico residual (genotipo de la hembra receptora). Pese a que el ovario es un órgano de rechazo inmunológico lento e incluso nulo (sitios inmunológicamente privilegiados),

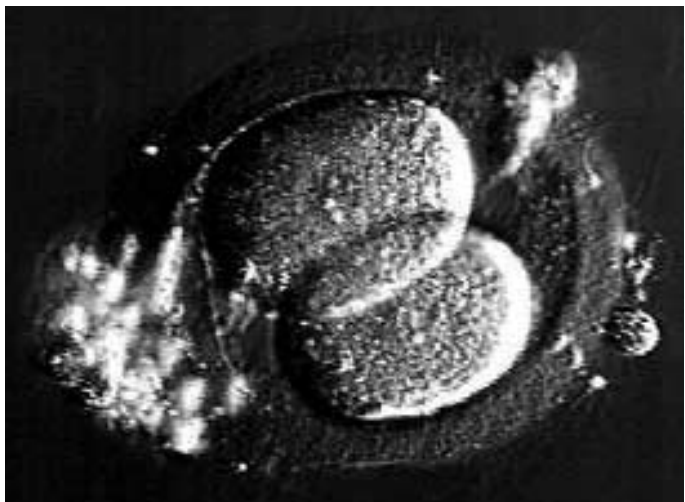
es conveniente emplear hembras receptoras que compartan la mayor cantidad de antígenos de histocompatibilidad (Capítulo V).

2.2.3.3 Fertilización *in vitro* (FIV)

Es una tecnología de reproducción asistida en la cual se fecundan uno o varios óvulos fuera del organismo materno. Desde fines de la década de 1970 se ha aplicado con éxito FIV (la sigla en inglés es IVF, por *in vitro fertilization*) en la reproducción humana y en la industria ganadera. El primer bebé obtenido por FIV (mal llamado bebé de probeta) fue una niña, en el año



Figura 2.5. Fertilización *in vitro* (FIV). La foto de arriba muestra lo que los especialistas llaman una "gota de FIV". En la misma podemos apreciar el ovocito maduro rodeado de células espermáticas tratando de fertilizarlo. Abajo, un embrión en estadio de 2 células listo para ser transplantado en la hembra receptora. Fotos: Gentileza del Dr. Jorge M Sztejn. *National Eye Institute, NIH, Maryland, Estados Unidos.*



1978 y el primer ternero producto de un embrión fertilizado y desarrollado *in vitro* data de la década de 1980. Como sucede con la IA, la FIV no está demasiado extendida en los laboratorios que crían roedores. En particular, podemos utilizar esta técnica con hembras transgénicas (o mutantes) de mucho valor que presentan problemas de fertilidad. Se puede utilizar la superovulación de estas hembras (ver Capítulo VIII) para tener más probabilidad de gestación (en ese caso, se transfieren entre 10 y 15 embriones). El esperma se obtiene a partir de los vasos deferentes y epidídimo, sacrificando a un macho joven (3 a 6 meses), y se distribuye en gotas de medio de cultivo (llamadas gotas de FIV), donde se los incuba. Los óvulos se extraen de los oviductos, sacrificio de la hembra mediante, y se mantienen en un medio de cultivo especial, luego se los añade a las gotas de FIV junto con el semen lavado e incubado (**Figura 2.5**).

La probabilidad de fecundación es del orden del 40-60% de los óvulos, dependiendo de la calidad del esperma (fresco o congelado), la línea de origen y la edad del macho donante, entre otros factores. Los óvulos fecundados y con un aspecto normal (generalmente en el estadio de dos células) se implantan quirúrgicamente en el oviducto de una hembra receptora (pseudopreñada), como en cualquier trasplante embrionario. Alrededor del 50% de los embriones transplantados llegará a término. Los protocolos detallados de los procedimientos de FIV en el ratón los podemos encontrar en el manual de Hogan y colaboradores (1994). Como veremos más adelante, el uso de semen congelado es un complemento ideal de esta técnica, con miras a la producción rápida y masiva de distintas cruzas experimentales de ratones (por ejemplo retrocruzas e intercruzas para mapeos de genes).

2.2.3.4 Método ICSI

El método **ICSI** (del inglés *intracytoplasmic sperm injection*) es una variante de las técnicas de fertilización asistida y consiste en la inyección de un espermatozoide directamente dentro del citoplasma del óvulo. Puede ser muy útil en el caso de ratones con espermatozoides de baja calidad (con alteraciones estructurales, baja motilidad etc.) o cantidad insuficiente como para intentar un IVF convencional. Se utiliza un sistema de micromanipulación que contiene una pipeta de sujeción (para sujetar al óvulo) y una aguja de inyección con una pieza especial llamada *piezo drill*. La aguja debe tener un tamaño similar al espermatozoide (no más de 6 micrones) y se carga con un sólo espermatozoide (seleccionado entre los de mejor morfología). Luego, se la introduce atravesando la zona pelúcida y el citoplasma del óvulo, donde se inyecta el espermatozoide con el menor volumen posible de líquido. Si bien su uso está bastante extendido en medicina humana, todavía no se ha desarrollado lo suficiente en el ratón como para ser incorporada como una técnica de uso general. Los reportes en el ratón muestran que la técnica es eficiente sólo cuando se utilizan ovocitos provenientes de híbridos F1 y que las combinaciones de esperma y ovocito de la misma línea consanguínea (estos estudios fueron hechos con la línea C57BL/6) tienen muy baja eficiencia (alrededor del 5%). Recientemente, se dio a conocer la obtención de crías vivas obtenidas por ICSI en la rata. El estudio fue realizado a partir de esperma congelado a -20°C y el uso de un micromanipulador con *piezo drill* en ratas Wistar y Sprague-Dawley, con una eficiencia del 10%. Por ahora, el método ICSI aparece como una alternativa muy prometedora, aunque algo sofisticada.

2.2.4 Rederivación de embriones y recién nacidos

Las técnicas de rederivación, ya sea transferencia de embriones o cesárea, se utilizan con el propósito de obtener animales libres de infecciones para introducirlos en animalarios (o áreas) libres de patógenos específicos (en inglés, *specific pathogen free* o SPF), o mejorar el estado sanitario del animalario. Hoy en día, la transferencia de embriones es el método preferido ya que permite eliminar aquellos organismos patógenos que pueden infectar al feto pasando a través de la placenta. La cesárea, en cambio, es una técnica quirúrgica que nos permite eliminar sólo aquellos patógenos que no atraviesan la placenta; aunque ha sido, por años, el método elegido para eliminar el virus de la hepatitis murina (MHV) de los animalarios.

El protocolo de la rederivación por trasplante embrionario es similar al utilizado en las etapas iniciales de la creación de ratones transgénicos: superovulación inducida por hormonas → fertilización natural → trasplante de los embriones a una hembra pseudopreñada (ver Capítulo VIII). La superovulación es la clave del éxito de esta técnica, y como veremos más adelante, la calidad de la respuesta a las hormonas es un rasgo específico de línea. Por eso, en el caso de querer pasar una línea de ratones con una mutación (o un transgén) hacia un área limpia, se recomienda cruzar los machos mutantes con hembras de líneas de buena respuesta a la superovulación. La hembra receptora (pseudopreñada) recibirá (por cirugía) a los embriones en el área limpia y llevará a cabo la preñez y el amamantamiento, sin aportar material genético a las crías. Para aquellos laboratorios que no posean el equipamiento técnico necesario o que carezcan de profesionales con experiencia en trasplante embrionario, la única alternativa será la cesárea de hembras a término (días 18-19 de preñez). En este caso, es esencial disponer de hembras nodrizas en el área limpia que estén listas para amamantar una camada adoptiva (básicamente que hayan parido en las últimas 24 horas).

2.3 Criopreservación de embriones y gametos

2.3.1 Principios de criobiología

La **criobiología** es el estudio de los procesos biológicos que ocurren durante la exposición a bajas temperaturas. Esta disciplina tiene sus fundamentos en principios físicos (temperatura y cambios de estado), químicos (composición de los crioprotectores) y biológicos (diferencias entre células, tejidos o especies). El proceso de **criopreservación** de embriones, tejidos o células consiste en descender la temperatura fisiológica hasta temperaturas negativas (-196°C en el caso del nitrógeno líquido). El descenso de la temperatura altera los procesos biológicos normales y hace que el metabolismo sea más lento y que las membranas celulares se contraigan, poniendo en riesgo la integridad estructural de la célula. De esta forma, si la congelación no se produce en una forma controlada resultará en un deterioro irreversible, e incompatible con la vida de la célula. En particular, existe una zona de letalidad con temperaturas intermedias (-15 a -60°C) que la célula debe atravesar dos veces (congelación y descongelación) durante el proceso.

La deshidratación parcial de la célula es vital para evitar que el agua forme cristales de hielo durante la congelación. Por esta razón, se añaden al medio de congelación soluciones **crioprotectoras**. La función de estos compuestos es desalojar el agua de la célula, evitando así la cristalización por el frío. Los crioprotectores son de variada estructura química y se dividen en permeantes y no permeantes, dependiendo de su capacidad de atravesar la membrana celular por difusión pasiva. Dentro del grupo de los permeantes se encuentran el metanol, el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propilenglicol. Como ejemplo de crioprotectores no permeantes tenemos a los azúcares (rafinosa y sucrosa, en particular), la albúmina bovina y distintos polímeros sintéticos como el PVP, entre otros.

Los daños de la congelación se deben a dos tipos de procesos: (i) la formación intracelular de hielo y (ii) la concentración elevada de solutos debido a la precipitación del agua en forma de hielo. El primer caso se da cuando la congelación se produce demasiado rápido, atrapando el agua dentro de la célula. El segundo tipo de daño se produce cuando la congelación es demasiado lenta, lo que expone a las células a las altas concentraciones de soluto. Cuando una solución comienza su congelación, se forman cristales de hielo y por lo tanto la concentración de la solución (relación entre moléculas de agua y moléculas de soluto en solución) aumenta.

Históricamente se han utilizado dos enfoques para la criopreservación: (i) la **congelación controlada** y (ii) la **vitrificación** (congelación ultra-rápida). Existen básicamente dos tipos de congelación controlada, la **congelación lenta** y la **congelación rápida**. En el sistema de congelación lenta, la temperatura desciende aproximadamente de 0,3 a 2°C por minuto en un medio con concentraciones bajas de crioprotectores (por ejemplo, glicerol 1,5M) hasta -30 a -80°C. De esta manera las células tienen tiempo suficiente para eliminar exceso de líquido (deshidratarse) y equilibrarse con el medio (por eso se llama también método de **congelación equilibrada**). Por el contrario, en los métodos de congelación rápida (llamados "casi equilibrados") la congelación ocurre más rápidamente (aproximadamente 200°C por minuto) que el tiempo requerido por las células para deshidratarse y equiparar la presión interna, por lo que existen más riesgos de que se formen cristales de hielo en su interior. En ambos métodos, el paso final será guardar los contenedores (criotubos, ampollas o pajuelas) en los tanques de nitrógeno líquido.

Por último, el método de vitrificación implica la formación de vidrio —en vez de cristales de hielo— en el interior de las células. Durante este proceso el agua llega al estado sólido (vítreo) sin pasar por la formación de cristales. Esto se logra por medio de una congelación ultra-rápida (>1000°C/min) y el uso de altas concentraciones de crioprotectores. Las células son deshidratadas, antes de la congelación, colocándolas en altas concentraciones de un crioprotector (> 6M). Este método presenta la ventaja de no tener que usar un sistema de congelación controlado (pudiéndose transferir las muestras directamente en nitrógeno líquido y sus vapores) y de no causar daños a la célula debido a que no se forman cristales de hielo. La única desventaja es la posible toxicidad del primer paso de deshidratación en el medio crioprotector. Para que las células no se vean afectadas, se debe controlar en forma muy precisa la concentración del medio crioprotector, la temperatura y el tiempo.

2.3.2 Congelación de embriones

Los primeros informes acerca de la congelación exitosa de embriones de ratón fueron publicados en la revista *Science* en el año 1972 por David Whittingham y colaboradores, usando el método equilibrado de congelación lenta. Como hemos mencionado, para preservar embriones en forma congelada se puede utilizar la congelación controlada y la vitrificación. Todos los estadíos de pre-implantación del embrión del ratón y la rata son aptos para una criopreservación utilizando una gran variedad de crioprotectores, condiciones de congelado/descongelado y contenedores. Sin embargo, el estadío de ocho células (día 3) es el momento de elección para muchos laboratorios, debido a su mayor resistencia a la manipulación. A modo de ejemplo, la eficiencia general del sistema, medida como porcentaje de crías vivas sobre el total de embriones descongelados, oscila entre 15% para la línea BALB/c y 50% para DBA/2.

Como ejemplos de métodos de congelación de embriones de rata y ratón podemos mencionar:

- (i) Método que utiliza pajuelas de plástico como contenedores, propilenglicol (1,5 M) como crioprotector y congelación lenta hasta -30°C (utilizado por el *Frozen Embryo & Sperm Archive* (FESA), MRC *Mammalian Genetics Unit*, Harwell, Inglaterra y el *Institut Pasteur*, París, Francia).
- (ii) Método con pajuelas de plástico, glicerol (1,5 M) como crioprotector y congelación lenta hasta -40°C (utilizado por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos).
- (iii) Método de vitrificación en nitrógeno líquido en un medio concentrado de glicerol y suero de albúmina bovina (utilizado por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos).

Los tres métodos enumerados se completan con la correspondiente descongelación de los embriones y la transferencia embrionaria en hembras receptoras.

Para establecer un servicio de criopreservación de embriones será necesario contar con las mismas instalaciones y habilidades técnicas que las necesarias para realizar FIV o ratones transgénicos. Sólo será necesario instalar los equipos de congelación, sean estos tan sencillos como baños de alcohol, tanques de nitrógeno o costosas congeladoras programables (**Figura 2.6**). Para más detalles sobre protocolos y marcas de equipos consultar el libro de I. Jackson y C. Abbott (2000).

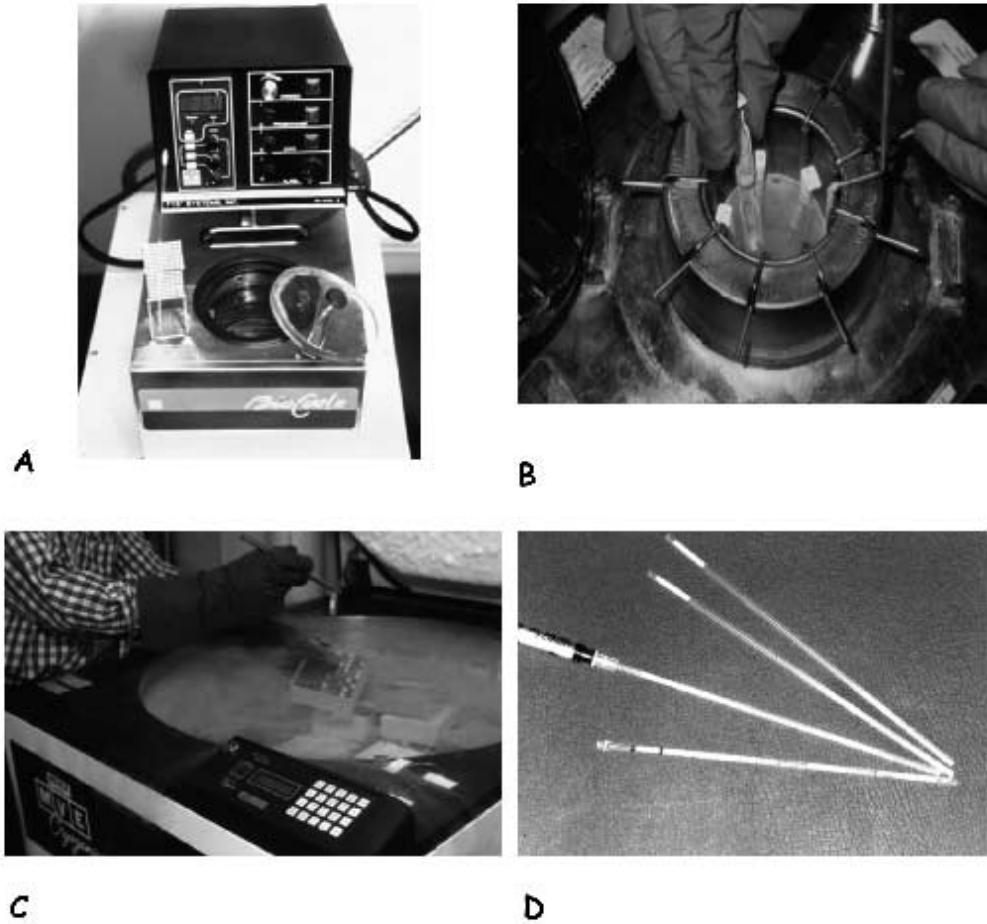


Figura 2.6. Equipamiento para la criopreservación. La foto A muestra un congelador de alcohol programable. A la derecha (B) un tanque de nitrógeno líquido y los viales de congelación. La foto C corresponde a un congelador de nitrógeno líquido de rellenado automático. La foto D muestra el tipo de pajuelas utilizadas para la congelación de embriones y esperma. Fotos: Gentileza del Dr. Jorge M Szein. *National Eye Institute, NIH, Frederick, Maryland, Estados Unidos.*

2.3.3 Congelación de gametos y gónadas

2.3.3.1 Congelación de esperma

A pesar de que la congelación de embriones de roedores es un procedimiento estándar desde hace años, fue sólo en la década de 1990 que se lograron avances importantes para estandarizar la congelación de esperma de ratón. Este retraso fue muy inesperado debido a que la misma técnica se viene usando con éxito en humanos y bovinos desde hace 50

años. La congelación de esperma es un recurso muy útil (y económico) para archivar y distribuir líneas de roedores de distintos orígenes, ya sean consanguíneas, mutantes, transgénicas o *knock outs* (KO). Las expectativas a largo plazo son muy buenas, ya que se tiene registro de oocitos de bovino fertilizados con éxito usando esperma congelado por 37 años. Combinada con la IA y la FIV, la congelación de esperma es una técnica esencial para los proyectos internacionales (conjuntos) de mutagénesis química (ver Capítulo VII) o dirigida en el ratón, ya que se pueden producir cientos de crías a partir de un sólo macho donante de esperma.

Básicamente, el éxito de la criopreservación del esperma del ratón se basó en el empleo de determinadas soluciones crioprotectoras, en particular aquellas conteniendo distintas proporciones de glicerol, DMSO y rafinosa. Este último crioprotector (un trisacárido), en combinación con leche en polvo, es sin duda uno de los más eficientes para la preservación de esperma de ratón. Los protocolos de congelación también necesitan contemplar tiempos muy precisos (ni muy lentos ni muy rápidos). Como lo hemos visto para la IA, el esperma a congelar se obtiene, fundamentalmente, del lavado del epidídimo y los vasos deferentes de un macho sacrificado. Otra alternativa es utilizar esperma eyaculado, sin sacrificar al macho. En esta variante, se sacrifica una hembra que fue montada por el macho y se realiza el lavaje (en inglés *flushing*) de los cuernos uterinos. Con tal motivo, se supervisa a la hembra cada media hora para detectar la presencia de tapón vaginal. Según algunos autores, este esperma es tan eficiente después de la congelación como el obtenido del epidídimo y los vasos deferentes.

Alrededor del 40% de los oocitos fecundados *in vitro* con esperma congelado (ya sea del epidídimo o eyaculado) llega al estado de embrión de dos células; de éstos, cerca del 90% puede desarrollar hasta un ratón a término. Es sabido que existen grandes diferencias entre líneas de ratones con respecto a la eficiencia de fertilización a partir de esperma congelado (**Tabla 2.2**). Lamentablemente, la línea C57BL/6 —una de las más usadas como fondo genético de líneas mutantes y transgénicas— es una de las que presenta más baja eficiencia. En estos casos, se puede favorecer la fertilización realizando la disección parcial de la zona pelúcida antes de la FIV, o por medio del mencionado método ICSI. Por el contrario, los híbridos F1 y los ratones no consanguíneos (exocriados) son los más eficientes al hacer una fertilización con esperma congelado, dato que no debería sorprender. A modo de ejemplo, el esperma congelado de un solo macho (C3H/HeH x BALB/c)F1 puede producir alrededor de 1000 crías por medio de la FIV. Al día de hoy existe una sola publicación informando de la obtención de ratas a término a partir de esperma (del epidídimo) criopreservado en nitrógeno líquido; en este caso el método utilizado combinó la congelación con la inseminación artificial intrauterina.

¿Cuáles son las ventajas de la congelación de esperma versus la congelación de embriones? En primer lugar, los machos no deben ser tratados hormonalmente y la colecta de esperma es más rápida que la de los embriones. Segundo, se sacrifican muy pocos animales ya que el número (potencial) de crías obtenido a partir del esperma de un macho es 20 veces mayor que el obtenido de la superovulación de una hembra. Para dar una idea, hace falta recolectar

Cepa	Esperma fresco		Esperma congelado	
	Embriones de 2 células	Blastocitos	Embriones de 2 células	Blastocitos
BALB/cJ	34%	82%	12%	56%
FVB/N	84%	66%	42%	44%
C57BL/6J	70%	85%	6%	60%
DBA/2J	78%	62%	34%	50%
129S3/Sv	53%	84%	6%	N/D

Tabla 2.2 Influencia del genotipo sobre la eficiencia de la FIV con esperma congelado de ratón. Se listan los porcentaje de embriones de dos células y blastocitos obtenidos *in vitro* luego de la FIV con esperma fresco en comparación con esperma congelado en distintas cepas consanguíneas. La fertilidad fue evaluada por la presencia de embriones de 2 células luego de 24 horas de cultivo en medio HTF y de blastocitos a las 48 horas de cultivo en medio KSOM/AA. En ambos casos, las condiciones de la incubadora fueron 5% CO₂/5% O₂ con N₂ balanceado. Adaptado de Sztejn *et al.*, *Biology of Reproduction* 63: 1774-1780, 2000.

entre 200 y 500 embriones antes de iniciar la congelación de una línea de ratones para asegurar el restablecimiento de la colonia a partir de los embriones congelados. Finalmente, es la única opción para aquellas líneas en las cuales las hembras tienen muy baja (o ninguna) fertilidad. Aquellos que trabajan en el área genética deberán recordar que, a diferencia de los embriones, estamos congelando (y salvaguardando) un genoma haploide.

Recientemente se ha comenzado a probar algunas alternativas a la congelación, como es el caso del esperma liofilizado (del inglés *freeze-dried*), el cual parece ser una técnica muy prometedora y claramente más práctica para el transporte, ya que resiste varios días a temperatura ambiente. La desventaja de este sistema es que, como el esperma está técnicamente muerto, debe ser inyectado directamente en los oocitos por medio de la técnica ICSI. Otro adelanto muy reciente ha sido la obtención de células espermáticas a partir de trasplantes de testículos provenientes de animales recién nacidos (hasta ahora comprobado en ratón, cerdo y cabra). Los trasplantes se realizaron en el dorso de ratones inmunodeficientes *nude* (castrados) y el tejido testicular logró proseguir con una espermatogénesis normal y producir células espermáticas maduras (con capacidad de fertilizar).

2.3.3.2 Congelación de oocitos y tejidos ováricos

Más allá del gran desarrollo de las técnicas de congelación de embriones en estado de preimplantación, la criopreservación de oocitos y tejidos ováricos ha sido siempre más complicada, debido a la extrema sensibilidad de éstos en condiciones no fisiológicas. No obstante, en el caso del ratón, se ha documentado la congelación de oocitos y tejidos ováricos con muy buenos resultados (mejores que los observados en otras especies de mamíferos). Tal es así, que la formación de bancos de oocitos y ovarios es hoy en día una alternativa muy interesante, particularmente para colonias de ratones subfértiles donde la congelación de embriones y de esperma no son posibles.

El primer reporte de ratones nacidos vivos a partir de oocitos congelados/descongelados y fertilizados *in vitro* data del año 1977. En el caso de los oocitos, existen dos estrategias de congelación: (i) en estado inmaduro, aislados del ovario en forma de vesícula germinal y (ii) en estado maduro (después de la ovulación) bajo la forma de oocitos en metafase II. Los crioprotectores más usados son el DMSO, el propilenglicol y el etilenglicol y el método de congelación lento es el de elección. Luego de la descongelación, en el caso de los oocitos inmaduros, es necesario realizar un esquema de FIV que contenga un paso de maduración y otro de cultivo. Esto se conoce como IVMFC (del inglés *in vitro maturation, fertilization and culture*). Por otro lado, si se utilizan oocitos en metafase II, sólo se agrega el paso de cultivo luego de la fertilización, lo que aumenta mucho la efectividad. Este último método se conoce como IVFC (*in vitro fertilization and culture*). En ambos casos se prosigue con los protocolos de transplante de embriones.

La congelación de tejidos ováricos como complemento de la técnica de transplante de ovarios ha interesado a los investigadores desde la década de 1950. La congelación de ovarios enteros es una ventaja de los roedores sobre otras especies de mamífero, debido a su pequeño tamaño. Sin embargo, es preferible congelar pedazos pequeños (alrededor de 2 mm³) de tejido ovárico. Los procedimientos de congelación lenta son los más adecuados para la preservación de los tejidos ováricos en la mayoría de las especies, en combinación con crioprotectores como el DMSO, el propilenglicol y el etilenglicol. Una vez descongelado el tejido ovárico, existen tres opciones: (i) aislamiento del folículo seguido de IVMFC y transplante embrionario, (ii) transplante ortotópico (en la bolsa ovárica) en una hembra receptora seguido de monta natural y (iii) transplante heterotópico (por ejemplo, debajo de la cápsula renal en ratones inmunodeficientes *nude*), seguido de la recuperación de oocitos, IVMFC y transplante embrionario.

La **Figura 2.7** presenta un esquema resumiendo las posibles combinaciones de las técnicas de reproducción asistida y la criopreservación. Estas técnicas son esenciales en la hora actual debido a la enorme expansión en el número de líneas de rata y ratón, en particular transgénicos y mutantes.

2.3.4 Bancos de embriones y gametos congelados

La posibilidad de establecer bancos de embriones y gametos, es decir el almacenamiento a largo plazo de distintas líneas consanguíneas y mutantes de ratones o ratas, ha sido recibida con mucho entusiasmo por los genetistas, ya que permite salvaguardar estos reactivos biológicos tan valiosos para la ciencia. De hecho, existen experiencias realizadas en *The Jackson Laboratory* y en el *MRC Mammalian Genetics Unit* que demuestran que los embriones de ratón pueden ser recuperados (viables) luego de 20 años de almacenamiento en forma congelada. La mayoría de los esfuerzos para establecer bancos de embriones criopreservados provenientes de modelos animales están concentrados en tan sólo unos pocos centros internacionales (todos orientados hacia los estudios genéticos). Estos son: *The Jackson Laboratory (Bar Harbor,*

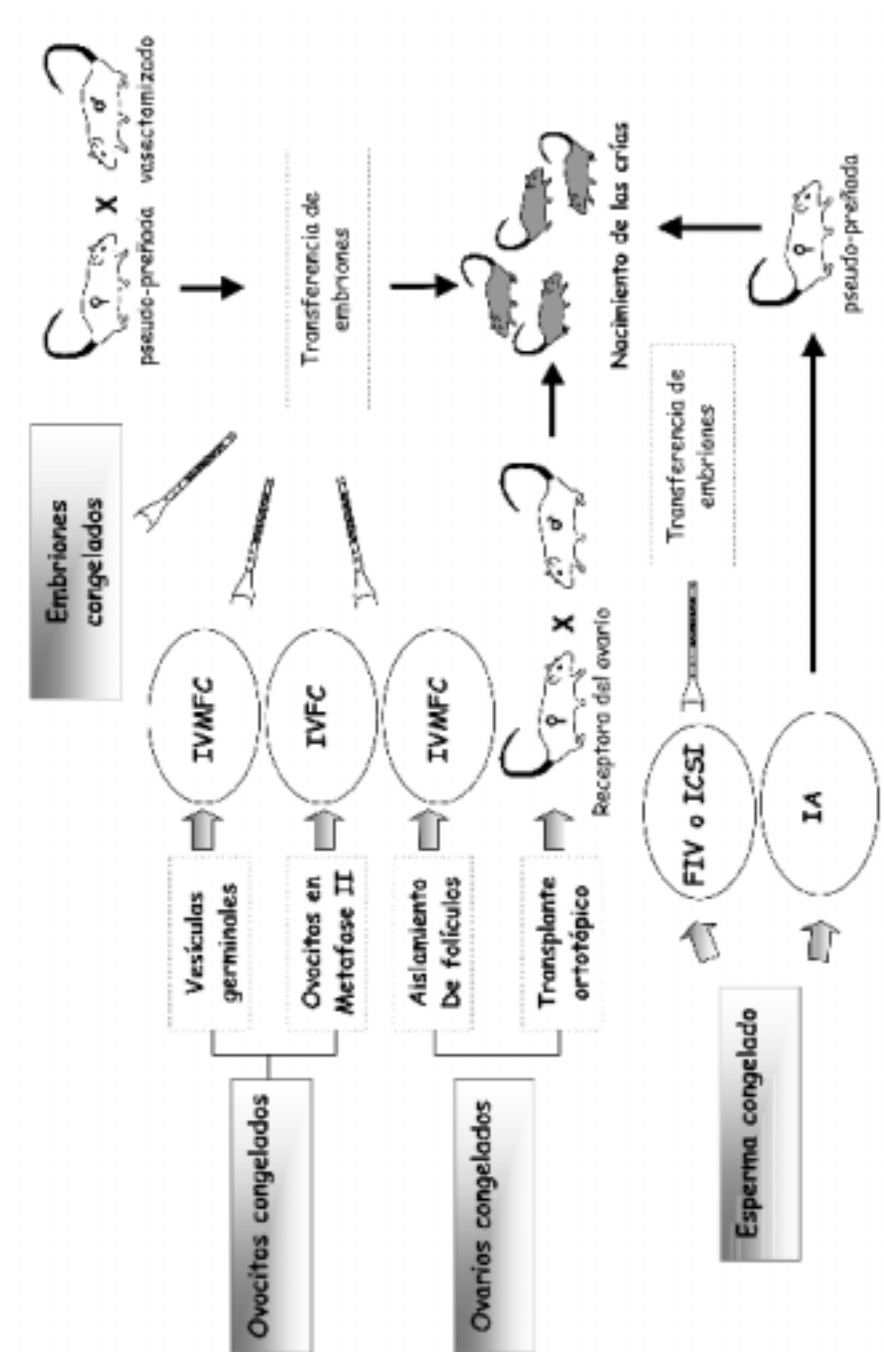


Figura 2.7. Estrategias de criopreservación y reproducción asistida. El diagrama esquematiza las posibles combinaciones entre las estrategias de criopreservación y los métodos de reproducción asistida. FIV: fertilización in vitro, ICSI: del inglés intracytoplasmic sperm injection IA: inseminación artificial, IVFC: del inglés in vitro fertilization and culture, IVMFC: del inglés in vitro maturation, fertilization and culture (ver texto).

Maine, Estados Unidos, <http://www.jax.org>), MRC Mammalian Genetics Unit (Harwell, Inglaterra, <http://www.mgu.har.ac.uk/>), NIH-Animal Genetic Resource (Bethesda, Maryland, Estados Unidos, <http://www.nih.gov/od/ors/dirs/vrp/nihagr.htm>), Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japón) y The European Mouse Mutant Archive (EMMA) y sus laboratorios asociados (Roma, Italia <http://www.emma.rm.cnr.it/>).

Se calcula que un total de dos millones de embriones de ratón (correspondientes a alrededor de 3000 modelos) se encuentran congelados en los repositorios de estos centros. Existen aproximadamente 200 modelos de rata en el mismo estado de criopreservación. El NIH-Animal Genetic Resource cuenta también con embriones congelados de conejo, además de los de rata y ratón. Muchos de estos modelos existen sólo en estado criopreservado, lo que The Jackson Laboratory identifica como nivel 5 de disponibilidad (aquellos que se descongelan sólo a pedido). Basándose en la eficiencia del sistema, podemos considerar que una línea o modelo murino (genotipo) estará criopreservada en un banco de embriones (lo que en inglés se conoce como *banked*) cuando: (i) se congelaron 500 embriones (suficiente para restablecer la línea entre 5 y 10 veces), (ii) se rederivaron crías de esos embriones, (iii) los animales rederivados evidenciaron el genotipo y, (iv) los animales rederivados se reprodujeron. Finalmente, es importante destacar que el costo de este almacenamiento es apenas equivalente al costo de mantenimiento de una colonia reproductora a lo largo de un año.

Los autores agradecen al Dr. Jorge M. Sztejn, colega y amigo en el *Veterinary Research and Resources Service, National Eye Institute, NIH, Maryland, Estados Unidos*, por su valiosa ayuda en la preparación de este capítulo.

Bibliografía General

- AGCA Y. *Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue*. ILAR Journal 41: 207-220, 2000.
- CALZONE T, MONTIJO KS, ST CLAIRE MB, LAMOREAUX E. *An integrated database for managing animal study proposals and animal inventory for the small animal facility*. Lab Animal (NY) 30: 28-31, 2001.
- CRITSER JK, MOBRAATEN LE. *Cryopreservation of murine spermatozoa*. ILAR Journal 41: 197-206, 2000.
- FOSTER HL, SMALL JD AND FOX JG (Eds). *The Mouse in Biomedical Research, Vol I*. Academic Press, New York, 1981.
- FOSTER HL, SMALL JD AND FOX JG (Eds). *The Mouse in Biomedical Research, Vol II*. Academic Press, New York, 1982.
- GAO D, CRITSER JK. *Mechanisms of cryoinjury in living cells*. ILAR Journal 41: 187-196, 2000.
- GLENISTER PH, THORNTON CE. *Cryoconservation-archiving for the future*. Mammalian Genome 11: 565-571, 2000.
- GREEN EL (Ed). *Biology of the laboratory mouse*. 2nd ed. Dover Publications, New York, 1975.
- HIRABAYASH M, KATO M, AOTO T, SEKIMOTO A, UEDA M, MIYOSHI I, KASAI N, HOCHI S. *Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm*. Transgenic Research 11: 221-228, 2002.
- HOGAN B, BEDDINGTON R, COSTANTINI F, LACEY E (Eds). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Man-*

- ual (2nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994.
- HONARAMOOZ A, SNEDAKER A, BOIANI M, SCHOLER H, DOBRINSKI I, SCHLATT S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 418: 778-781, 2002.
- JACKSON, I AND ABBOTT C (Eds). *Mouse Genetics and Transgenics. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 2000.
- KAWASE Y, IWATA T, TOYODA Y, WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R, SUZUKI H. Comparison of intracytoplasmic sperm injection for inbred and hybrid mice. *Molecular Reproduction and Development* 60: 74-78, 2001.
- KAUFMAN, MH. *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press, New York, 1992.
- NAKAGATA N, OKAMOTO M, UEDA O, SUZUKI H. Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the in vitro fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6j transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biology of Reproduction* 57: 1050-1055, 1997.
- NAKATSUKASA E, INOMATA T, IKEDA T, SHINO M, KASHIWAZAKI N. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 degrees C. *Reproduction* 122: 463-467, 2001.
- NOVAK G, SCHUB T. *Software for lab animal facilities*. *Lab Animal (NY)* 30: 39-43, 2001.
- MARSCHALL S, HRABE DE ANGELIS M. Cryopreservation of mouse spermatozoa: double your mouse space. *Trends in Genetics* 15: 128-131, 1999.
- OBATA Y, KONO T, HATADA I. Gene silencing: maturation of mouse fetal germ cells in vitro. *Nature* 418: 497, 2002.
- POILEY SM. A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animals colonies. *Proceedings of the Animal Care Panel* 10: 159, 1960.
- RALL WF, SCHMIDT PM, LIN X, BROWN SS, WARD AC, HANSEN CT. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. *ILAR Journal* 41: 221-227, 2000.
- RUGH, R. *The Mouse: Its Reproduction and Development*. Oxford University Press, Oxford, 1990.
- SILVER LM (ed) *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. Oxford University Press, Oxford, 1995. (Versión online disponible en <http://www.informatics.jax.org/silver/>)
- SNOW M, COX SL, JENKIN G, TROUNSON A, SHAW J. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science* 297: 2227, 2002.
- SONGSASEN N, LEIBO SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology* 35: 240-254, 1997.
- SONGSASEN N, LEIBO SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* 35: 255-269, 1997.
- SONGSASEN N, BETTERIDGE KJ, LEIBO SP. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biology of Reproduction* 56: 143-152, 1997.
- SONGSASEN N, LEIBO SP. Live mice from cryopreserved embryos derived in vitro with cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Laboratory Animal Science* 48: 275-281, 1998.
- SZTEIN JM, SWEET H, FARLEY J, MOBRAATEN L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biology of Reproduction* 58: 1071-1074, 1998.
- SZTEIN JM, MCGREGOR TE, BEDIGIAN HJ, MOBRAATEN LE. Transgenic mouse strain rescue by frozen ovaries. *Laboratory Animal Science* 49: 99-100, 1999.
- SZTEIN JM, FARLEY JS, MOBRAATEN LE. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biology of Reproduction* 63: 1774-1780, 2000.
- SZTEIN JM, O'BRIEN MJ, FARLEY JS, MOBRAATEN LE, EPPIG JJ. Rescue of oocytes from antral follicles of cryopreserved mouse ovaries: competence to undergo maturation, embryogenesis, and development to term. *Human Reproduction* 15: 567-571, 2000.
- SHARP JJ, LINDER CC, MOBRAATEN LE. Genetically engineered mice. *Husbandry and resources*. *Methods in Molecular Biology* 158: 381-396, 2001.
- TADA N, SATO M, YAMANOI J, MIZOROGI T, KASAI K, OGAWA S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 511-516, 1990.
- THEILER K. *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. Springer-Verlag, 1989.
- THORNTON CE, BROWN SD, GLENISTER PH. Large numbers of mice established by in vitro fertilization with

- cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens and mouse backcrosses.* Mammalian Genome 10: 987-992, 1999.
- WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. *Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa.* Nature Biotechnology 16: 639-641, 1998.
- WHITTINGHAM DG, LEIBO SP, MAZUR P. *Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C.* Science 178: 411-414, 1972.
- WHITTINGHAM DG, LYON MF, GLENISTER PH. *Long-term storage of mouse embryos at -196 degrees C: the effect of background radiation.* Genetical Research 29: 171-181, 1977.
- WHITTINGHAM DG. *Re-establishment of breeding stocks of mutant and inbred strains of mice from embryos stored at 196 degrees C for prolonged periods.* Genetical Research 30: 287-299, 1977.
- WHITTINGHAM DG. *Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 degrees C.* Journal of Reproduction and Fertility 49: 89-94, 1977.