Interferón y Biotecnología, Vol. 6, No. 1, 72-79 (1989)

Técnicas

Microinyección y trasplante de embriones unicelulares de ratón. I.Confección de microinstrumentos y obtención de embriones unicelulares

F.O. CASTRO y A. AGUILAR

Laboratorio de Transgénesis. Agrupación de Hibridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en febrero de 1988
Aprobado en agosto de 1988

INTRODUCCION

La obtención de ratones transgénicos con ADN ajeno mediante la microinyección de embriones murinos en estadio pronuclear, es un proceso de múltiples pasos; para ello se requieren: 1) Confección de microinstrumentos para la manipulación embrionaria. 2) Obtención de embriones unicelulares. 3) Microinyección, cultivo y trasplante de los embriones.

Los primeros trabajos de microinyección de embriones de ratón con ADN fueron realizados por Gordon y Ruddle en 1980, sobre la base de las técnicas descritas previamente por Diacumakos (1973) y Jaenisch (1974). Desde entonces se han publicado numerosos trabajos relacionados con la microinyección de ADN a embriones de mamíferos (Brinster *et al.*, 1985; Burki, 1986; Gordon y Ruddle, 1983; Hogan *et al.*, 1986; Sally, 1987).

Esta comunicación constará de dos partes. En la primera se abordará la técnica de confección de microinstrumentos necesarios para la manipulación de embriones, así como la obtención de embriones unicelulares de ratón. La segunda parte versará sobre la microinyección, el cultivo, y el trasplante de embriones unicelulares de ratón. Es nuestro objetivo transmitir la experiencia que al respecto ha desarrollado con éxito nuestro laboratorio.

CONFECCION DE MICROINSTRUMENTOS

La micromanipulación de embriones requiere la confección de instrumentos de diseño especial pues los embriones tienen un diámetro que oscila entre 80 y 100 μ, han de ser manipulados en pequeñísimos volúmenes de medio cultivo, y finalmente, serán transferidos al infundíbulo de ratonas pseudopreñadas, siendo esta región anatómica imposible de explorar a simple vista.

Estos microinstrumentos no son ofertados comercialmente y deben ser elaborados en el propio laboratorio donde se realice la micromanipulación embrionaria.

Para los efectos de obtención, microinyección y transferencia de embriones unicelulares de ratón, son necesarios los instrumentos siguientes:

Micropipetas de manejo. Se utilizan para manipular el embrión una vez extraído del oviducto.

Micropipetas de sujeción. Estas pipetas sostienen al embrión durante la microinyección.

Micropipetas de inyección. (Agujas o microagujas.)

Micropipetas de transferencia. Se utilizan para realizar el trasplante de los embriones microinyectados al oviducto de las hembras receptoras.

Confección de micropipetas de manipulación

1. Exponga la punta de una pipeta Pasteur de 140 mm de largo, a la llama azul y potente de un mechero; cuando el vidrio comience a fundirse, tire de ambos extremos fuertemente a la vez que es retirada la pipeta del fuego.

2. Corte en un microscopio estereoscópico dotado de lente milimetrado la porción correspondiente a 150 μm aproximadamente; para ello utilice un lápiz con punta de diamante. Proceda a estirar el otro extremo de la pipeta. El diámetro del mismo debe ser de aproximadamente 1 cm, y en él se acoplará un tubo de goma con boquilla para el control, mediante la boca, de una serie de operaciones de manipulación embrionaria.

Observaciones: Prepare y mantenga siempre una reserva de cada uno de los microinstrumentos que en esta sección se describen; para realizar este paso colóquelos sobre cinta adhesiva, en placas Petri de vidrio, y esterilice por horneo. Conserve los microinstrumentos en esta forma hasta el momento de su utilización.

Confección de micropipetas de sujeción

1. Exponga la porción central de un microcapilar a la llama pequeña y estable de un mechero; cuando el vidrio comience a fundirse, estire bruscamente el capilar, corte en un estéreo microscopio la porción correspondiente a 80-100 μ, con la ayuda de un lápiz de diamante. El largo de la región estirada no debe ser mayor de 2-3 cm (figura 1).

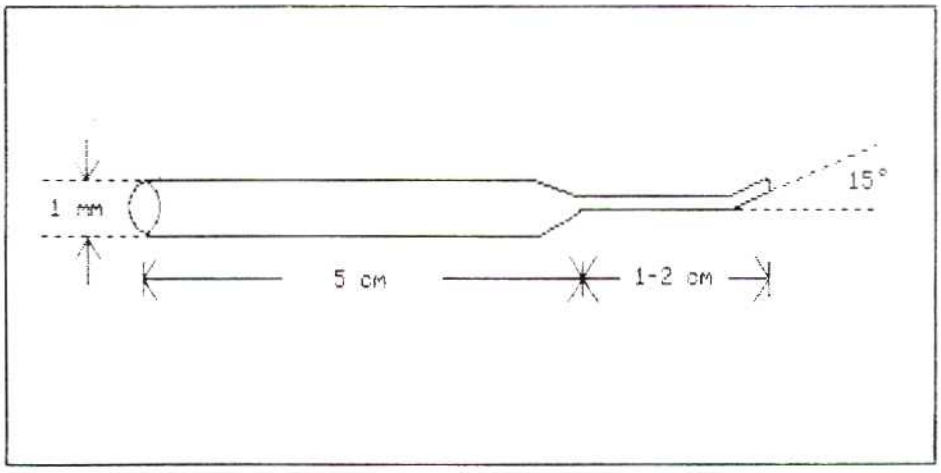

FIG. 1. Micropipeta de sujeción de embriones. Se señalan las dimensiones de longitud y ángulo.

2. Redondee la punta del capilar estirado y cortado en una microforja, controlando que la luz interna no se reduzca más de 50 μ (figura 2).

3 Proporciónele un ángulo de unos 15 grados con respecto al eje horizontal de la pipeta.

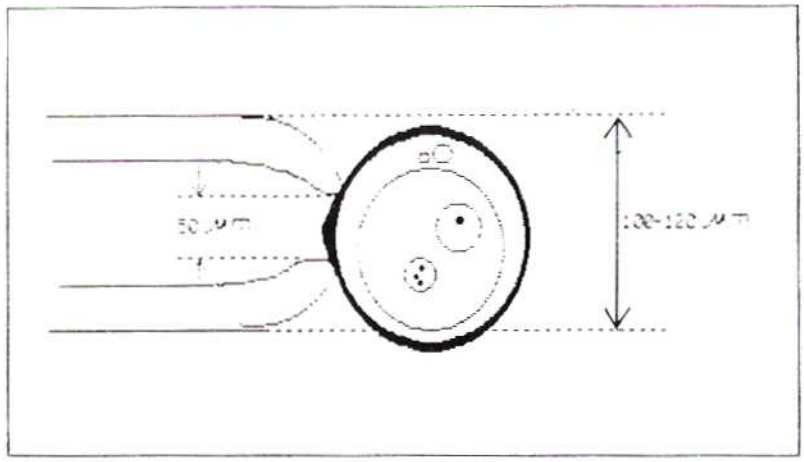

FIG. 2. Micropipeta de sujeción de embriones. Se señalan las dimensiones de los diámetros interno y externo de la punta de la pipeta.

Por lo general, es utilizada una pipeta de sujeción durante toda la tanda de microinyección. No obstante, es recomendable disponer de una reserva de 4-5 pipetas estériles para posibles eventualidades.

Confección de micropipetas de transferencia

En nuestro laboratorio confeccionamos las pipetas de transferencia a partir de las pipetas Pasteur utilizadas para obtener micropipetas de manejo. Una vez cortada la punta estirada de la pipeta de manejo, la porción restante es tomada con el fin de elaborar la micropipeta de transferencia; para ello:

1. Coloque a la llama la porción anteriormente mencionada, estire bruscamente por ambos extremos de la pipeta y corte con un lápiz de diamante. El largo de la punta no debe sobrepasar los 2 cm y su diámetro interno debe quedar entre 120 y 180 μ.

2. Redondee la punta en una microforja o en una llama pequeña.

3. Redondee el extremo opuesto a la punta (destinado al acople con la pieza de soplar).

Si resulta más cómodo para la manipulación, se le puede proporcionar a la punta el ángulo que se desee.

Almacénese en las condiciones descritas para el resto de los microinstrumentos.

Confección de las microagujas de inyección

Las microagujas para inyección de ADN deben tener un diámetro interno cercano o inferior a la micra, y se confeccionan a partir de microcapilares Clark u otros similares

que posean un finísimo filamento interno, lo que permite llenar la microaguja por acción capilar.

Los capilares se alargan hasta obtener el diámetro interno deseado, en un equipo denominado *estirador de agujas*; el principio de trabajo de este equipo se basa en calentar el capilar pasándolo a través de un filamento o resistencia, fijando cada extremo del capilar con mordazas, a la vez que se le aplican diferentes fuerzas (magnéticas, mecánicas o ambas en conjunto) en dependencia del equipo que se utilice.

La combinación adecuada de temperatura y fuerza de atracción que resulte en microagujas del diámetro deseado, debe ser hallada por el operario del equipo.

Las microagujas han de confeccionarse el mismo día que se vayan a utilizar con el fin de protegerlas contra la obstrucción por polvo, y deben ser guardadas como se ha descrito para el resto de los microinstrumentos. Si los embriones que se inyectaron fueran a transferirse en el mismo día, no es necesario esterilizar las microagujas; en otro caso, se deben hornear a 180 grados durante 90 minutos.

OBTENCION DE EMBRIONES UNICELULARES

Los embriones unicelulares de ratón pueden ser obtenidos a partir de la ovulación espontánea de las hembras, o después de su inducción mediante la administración de hormonas gonadotróficas (superovulación).

Superovulación

Las hembras donantes de embriones deben ser mantenidas en condiciones de temperatura, humedad y luminosidad controladas. El ciclo de luminosidad debe tener de 12 a 14 horas de luz, y de 10 a 12 horas de oscuridad, para asegurar una correcta acción de las hormonas.

La edad óptima de las hembras debe estar entre 4 y 6 semanas y su peso entre 14 y 20 gramos. La línea de ratón que se utilice es de gran importancia, pues los ratones hembras de líneas consanguíneas, por lo general, son poco ovuladores. Para obtener un gran número de embriones, en aras de la economía de animales, los híbridos F-1 son preferibles como líneas parentales. Si es necesario un fondo genético conocido, lo correcto es utilizar hembras de líneas consanguíneas. Siempre deben usarse grupos homogéneos de animales.

El procedimiento inductor de la superovulación que recomendamos es el siguiente:

1. Inyecte por vía intraperitoneal (i.p.) 10 hembras, aproximadamente al mediodía, cada una con 5 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG).
2. Entre 46 y 48 horas después inyecte cada animal i.p. con 5 UI de gonadotropina coriónica humana (HCG).
3. Coloque cada hembra con un macho de probada fertilidad. (Dos hembras pueden ser colocadas con un mismo macho.)
4. A las 08:00 horas del día siguiente, chequee la vagina de las hembras y seleccione aquellas que presenten una secreción amarillenta solidificada en la apertura vaginal (tapón vaginal), que se consideren fecundadas (día cero de preñez). En ocasiones, el tapón vaginal es profundo y es preciso comprobarlo con fórceps curvos pequeños.

Semejante procedimiento superovulatorio ofrece resultados positivos, generalmente, en la fertilización de 6-10 hembras. Entre las 09:00 y las 10:00 horas de la mañana proceda a obtener los embriones unicelulares, para ello:

En una placa Petri plástica de 35 mm coloque con una micropipeta varias microgotas (5-10 μl c/u) de medio M-2* en tres hileras de tres gotas y cúbralas con aceite de parafina. Coloque la placa Petri en una incubadora de atmósfera controlada (5 % de CO_2 -95 % aire) a 37°C.

En la parte inferior de una placa Petri plástica de 100 mm, coloque dos gotas de medio M-2 por cada hembra que se vaya a sacrificar, y proceda a extraer los oviductos con ayuda de dos pinzas y una tijera estériles, tal como se describe a continuación:

- sacrifique una ratona por dislocación cervical; colóquela en posición dorsal sobre una mesa de trabajo cubierta con un paño limpio;
- lave el abdomen con etanol al 70 %;
- con una de las pinzas romas levante la piel al nivel del segundo par de mamas; haga un ligero corte y retire la piel tirando suavemente con los dedos pulgar e índice de ambas manos, en direcciones opuestas;
- corte la pared peritoneal con tijeras curvas; aparte los intestinos con la pinza roma, para exponer los órganos reproductivos: el útero aparece alargado y con coloración violácea, y los ovarios redondeados y cubiertos de almohadillas de grasa;
- sostenga el útero con la pinza roma, sin dañarlo; con los fórceps finos perfore la membrana mesentérica, libere el útero de dicha membrana con las tijeras, avanzando en dirección del ovario. Con extremo cuidado elimine la grasa que rodea el ovario;
- corte con las tijeras (preferiblemente curvas) por encima del ovario y lo más próximo posible a este, mientras lo sostiene con uno de los fórceps. Proceda a seccionar el útero unos pocos milímetros por debajo de la unión útero-tubárica. De esta manera se habrá garantizado extraer un fragmento del tracto genital que incluya el ámpula, zona donde se encuentran los óvulos recién fecundados. Proceda de idéntica manera con el otro cuerno uterino;
- pase uno de los oviductos a la placa Petri con gotas de M-2 y colóquela sobre la platina de un microscopio estereoscópico con luz transmitida; localice la región del ámpula bajo el estéreo (con aumentos de 25 a 40). El ámpula es fácil de distinguir entre los anillos del oviducto y muy próxima al ovario, porque después de la fecundación se encuentra muy aumentada de tamaño; además, su membrana es más delgada y transparente que la del resto del oviducto.

5. Fijando el ámpula al fondo de la placa Petri, proceda a desgarrarla con pinzas de relojero, para obtener un racimo constituido por las células foliculares, en medio de las cuales se encuentran los embriones.

6. Succione el cúmulo de embriones y células con una pipeta de manipulación acoplada a una boquilla y un tubo de goma, y deposítelo en una microgota de medio M-2 suplementada con 300 μ/ml de hialuronidasa. Deje los embriones en esta gota durante unos minutos, hasta que la enzima digiera la gran cantidad de células que los rodean.

7. Con la ayuda de una pipeta de manipulación lave los embriones mediante pases sucesivos por 2 ó 3 microgotas de M-2, para eliminar los residuos de hialuronidasa y el celular.

* El medio de cultivo que se emplea, M-2, es una variante del medio Whitten (Hogan *et al.*, 1986).

Los embriones se clasifican en: degenerados (con morfología e integridad visiblemente dañadas), o fertilizados (presentan pronúcleos visibles o dos corpúsculos polares). En ocasiones, junto a embriones unicelulares se encuentran otros en estadios más desarrollados (bicelulares), así como óvulos sin fecundar.

8. Lave los embriones en medio M-2, de igual manera a la indicada y transfiera de 10 a 15 embriones a cada una de las microgotas descritas en el punto 1; coloque la placa nuevamente en la incubadora.

9. Repita los pasos del 4-8 con los restantes oviductos.

La manipulación aquí descrita no debe de exceder los 15 minutos para cada oviducto. De una hembra F-1 superovulada (por ejemplo, C57BL/6 x CBA/CA), se obtienen como promedio 30-35 embriones.

REFERENCIAS

BURKI, K. (1986). "Experimental embryology of the mouse". En: *Monographs in Developmental Biology.* Ed. H. W Sauer, Karger, USA.

DIACUMAKOS, E.G. (1973). "Methods in Cell Biology", 7.D.M. Prescott ed. N.Y. Academic Press, pp. 287-311.

GORDON, J.W.; SCANGOS, G.A.; PLOTKIN, D.J.; BARBOSA, J.A. y RUDDLE, F.H. (1980). *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77** (12): 7380-7384.

GORDON, J.W. y RUDDLE, F.H. (1983). *Gene transfer into mouse embryos production of transgenic mice by pronuclear injection.* Methods in Enzymology **101**: 411-413.

HOGAN, B.F.; CONSTANTINI, F. Y LACY, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo: A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.

JAENISCH, R. y B. MINTZ (1974). *Simian Virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **71**: 1250-1254.

PETTERS, R.M.; B.H. JONHSON y W.E. MERCER (1987). Production of transgenic mice following deoxyribonucleic acid microinjection and embryo freezing. Theriogenology, **27** (3): 507-515.

SALLY, A. (1987). *Research applications of transgenic mice. Biotechniques, Vol.* **5** (6).

* * *

Procedimiento para el marcaje de células tumorales con Cr^{51}

I. APEZTEGUÍA y S.E. PEREA

Centro de Investigaciones Biológicas, Apartado 6996, Cubanacán, La Habana, Cuba

El marcaje de células tumorales de diferentes orígenes con Cr^{51}, ha sido ampliamente utilizado en los ensayos de citotoxicidad de distintas poblaciones de células efectoras de la inmunidad mediada por células, entre los cuales se encuentran la actividad Natural Killer (NK) (Timonem *et al.*, 1981), Lymphocyte-Actived-Killer (LAK) (Rosenberg *et al.*, 1984), Tumor-Infiltring Limphocytes (TIL) (Lafreniere *et al.*), 1984, entre otras.

A continuación se expone un procedimiento para el marcaje de células en suspensión, que garantiza una mejor incorporación del radioisótopo al interior de ellas.