

Microinyección y trasplante de embriones unicelulares de ratón. II. Microinyección, cultivo y trasplante 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 julio de 1988

Aceptado en septiembre de 1988

INTRODUCCION

En la primera parte de esta comunicación (Vol. 6, No. 1, 1989) se describieron las técnicas comúnmente usadas en nuestro laboratorio para la confección de microinstrumentos destinados a la manipulación embrionaria, así como los procedimientos de obtención de embriones unicelulares de ratón. Esta segunda parte tratará acerca de la microinyección, el cultivo y la transferencia de embriones unicelulares.

MICROINYECCION DE EMBRIONES UNICELULARES

Preparación del ADN que se inyectará

El ADN que se inyectará debe ser preparado con anterioridad y mantenido en congelación hasta su uso. El material genético debe ser linealizado y separado de las secuencias procarióticas del vector en que se encuentre, ya que se ha determinado que ellas afectan la expresión del gen introducido (Hammer *et al.*, 1985; Townes *et al.*, 1985).

La muestra se diluye hasta una concentración de 1-2 ng/ μ l en tampón TRIS-HCl, pH 7,5 + 0,25 nM de EDTA. Se recomienda centrifugar el ADN (12 500 x g x 10 minutos) antes de utilizarlo en la inyección, ya que los agregados pueden obstruir la microaguja.

Montaje del sistema de microinyección

El sistema de microinyección está compuesto por un microscopio invertido con dispositivo de contraste interferencial, dos micromanipuladores dispuestos a ambos lados de la platina y un equipo de microinyección acoplado a un sistema de aire comprimido.

Los embriones son colocados sobre un portaobjeto excavado, cubierto con aceite de parafina, utilizando para ello una micropipeta de manipulación.

Microinyección

1. Coloque un portaobjeto excavado estéril en la platina del microscopio y con una pipeta de manejo estéril, vierta una pequeña gota de medio M-2 en el centro del portaobjeto; recubra con aceite de parafina.

2. Coloque una pipeta de succión, acoplada mediante un tubo de goma a una boquilla, en uno de los micromanipuladores.

3. Utilizando los mandos macrométricos y micrométricos del micromanipulador, sumerja la pipeta en la gota. Enfoque en 63-100 aumentos. La pipeta debe estar bien cercana al fondo, pero sin tocarlo.

4. Extraiga los embriones de la incubadora y con una pipeta de manejo estéril, seleccione un grupo de 10-15 embriones, deposítelos en la microgota, cerca de la pipeta de sostén.

5. Enfoque en 100 aumentos los embriones y cerciórese de que estén en el mismo plano focal que la pipeta; de no ser así, desplace la pipeta mediante el uso del mando Z del micromanipulador.

6. Tome una microaguja de inyección, con la precaución de no tocar los extremos, e introduzca la parte posterior de ésta dentro del tubo que contiene el ADN, la que se llenará por acción capilar, (resulta fácil de comprobar, observando la punta por donde se verá descender el líquido).

7. Coloque la pipeta de inyección en el portacapilares del microinyector y éste, a su vez, en el segundo micromanipulador. Observando por el microscopio, a aumentos pequeños, introduzca la pipeta en la microgota, utilizando para ello los mandos macrométricos y micrométricos.

8. Enfoque correctamente la microaguja y los embriones. Mediante el mando Z del micromanipulador, succione suavemente un embrión con la pipeta de sostén.

9. Localice dentro del embrión el o los pronúcleos, volteándolo si es necesario. Para esta última operación libere el embrión de la pipeta de succión, hágalo rotar con la de inyección y sujete de nuevo para localizar los pronúcleos. En caso de no detectarse pronúcleos, se considera el embrión "no inyectable" y se traslada con la pipeta de sostén al cuadrante superior derecho del campo visual. Si el embrión es inyectable, entonces se procede de la siguiente forma:

10. Pase a contraste interferencial, y a aumentos de 250. Coloque el régimen de trabajo manual del microinyector.

11. Inserte la aguja dentro del pronúcleo y descargue una dosis de inyección. Si se observa que el pronúcleo aumenta al doble de su tamaño, se retira la aguja y se considera la microinyección realizada. No siempre la microinyección es exitosa, pues la membrana citoplasmática es elástica en extremo. En ocasiones, la aguja no penetra el pronúcleo o ni siquiera atraviesa la membrana nuclear. En este caso, repita la operación.

Si se observa que después de la inyección la célula comienza un evidente proceso de lisis y de salida del material intracelular al medio, esto puede tener cuatro causas: *a*) la microaguja es demasiado gruesa, *b*) se ha partido la punta de la microaguja, *c*) la presión de inyección es demasiado alta, *d*) el tiempo de inyección es muy grande. Otro aspecto a tener en cuenta durante la microinyección es evitar tocar los nucléolos en el interior de los pronúcleos, ya que ellos son en extremo adhesivos e inevitablemente obstruirán la microaguja.

12. Si la inyección fue exitosa, fije el valor de tiempo de inyección logrado en el régimen manual y pase al automático.

13. Desplace el embrión microinyectado con la pipeta de sostén al cuadrante inferior izquierdo del campo visual y manipule el próximo embrión.

Una vez terminada la microinyección del último embrión del lote, cuente los inyectados, los sobrevivientes y los que no soportaron la microinyección.

Con una pipeta de manejo estéril, retire los microinyectados, lávelos en M-2 y colóquelos en la microgota de cultivo. Incube a 37°C en atmósfera de 5 % CO₂ durante 1-2 horas.

Coloque un nuevo lote de 10-15 embriones y repita todo el proceso. Con el procedimiento aquí descrito es posible lograr hasta el 80 % de supervivencia de los embriones (Brinster *et al.*, 1985) e inyectar de 40 a 60 embriones en 1-2 horas (Gordon *et al.*, 1980).

TRANSFERENCIA DE LOS EMBRIONES MICROINYECTADOS

Una vez microinyectados, los embriones han de transferirse a hembras seudopreñadas.

Preparación de hembras seudopreñadas

Las hembras seudopreñadas o madres receptoras de embriones, pueden ser preparadas mediante superovulación u ovulación espontánea. Nosotros preferimos utilizar hembras con ovulación espontánea, con las cuales hemos obtenido mejores resultados.

Han de tenerse en cuenta los aspectos siguientes:

1. Seleccione una hembra receptora de embriones por cada dos donantes. Los requerimientos para con las hembras receptoras son los mismos que se utilizan con las donantes.

2. A la misma hora de la inyección de HCG a las hembras donantes, aparece cada hembra receptora con un macho vasectomizado de probada infertilidad. Los machos vasectomizados son preparados mediante cauterización de los canales eferentes de espermatozoides y probados por apareamiento constante durante dos meses con varias hembras.

3. A la mañana siguiente chequee la presencia del tapón vaginal, como se ha descrito previamente.

4. Manténgalas sin alimento hasta el momento de ser utilizadas.

Transferencia de los embriones

La transferencia puede realizarse con cultivo o sin cultivo de embriones. La transferencia sin cultivo (entiéndase la incubación estrictamente necesaria de los embriones por 1-2 horas para comprobar su viabilidad), es necesario realizarla al oviducto de las hembras receptoras. La transferencia en oviducto requiere de práctica y es técnicamente compleja. La otra opción es cultivar los embriones hasta blastocisto y realizar la transferencia al útero. Semejante procedimiento es simple, aunque la eficiencia de la técnica disminuye notablemente como resultado del prolongado período de cultivo (3,5 días).

A continuación se describe el proceso de trasplante de los embriones en el oviducto:

1. Pese una de las hembras pseudopreñadas y aplique un anestésico, según indicaciones del producto.
2. Depile el dorso del animal a ambos lados de la columna vertebral, por debajo de la última costilla.
3. Con una pipeta de manipulación estéril, pase a una gota de medio M-2, de 15 a 20 embriones microinyectados sobrevivientes.
4. En el menor volumen de medio posible pase los embriones a una pipeta de transferencia estéril y déjelos en reposo, hasta el momento de ser transferidos.
5. Lave el dorso del animal con etanol al 70 % y con unas tijeras curvas realice una incisión de 1 cm, perpendicular al eje vertebral, aproximadamente a 1 cm del mismo, al nivel de la última costilla; de esta manera se hará visible la pared peritoneal.
6. Para localizar el ovario a través de dicha pared, sujete con pinzas la piel a ambos bordes de la herida y mueva el orificio sobre ésta hasta distinguir el ovario que se caracteriza por su coloración naranja.
7. Levante la pared peritoneal con fórceps finos exactamente sobre el ovario y realice un pequeño corte.
8. A través de este corte introduzca unas pinzas romas, y con extremo cuidado, exponga el ovario y el oviducto, tirando de la almohadilla de grasa que rodea al ovario.
9. Fije los órganos con una pinza, para evitar movimientos indeseados.
10. Coloque el ratón en la tapa de una placa Petri de 100 mm y la placa en la platina de un estereoscopio.
11. Localice el ámpula del oviducto, y siguiendo su curso en dirección craneal, encuentre la entrada del infundíbulo, que se halla debajo de la membrana ovárica (figura 1).
12. Perfore la membrana ovárica y sostenga con pinzas de relojero la entrada del infundíbulo, mientras que se le introduce la pipeta de transferencia y los embriones son expelidos en el interior del mismo soplando suavemente.

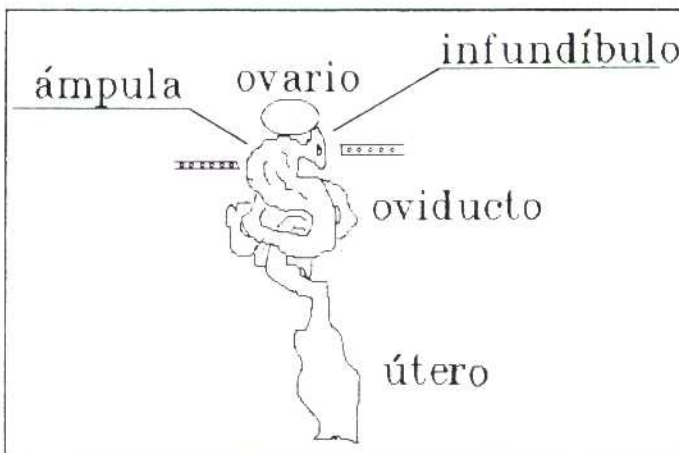


FIG. 1. Esquema ilustrativo de una porción anatómica del tracto reproductivo de una ratona. Las micropipetas con embriones indican los dos sitios por donde puede ser llevada a cabo la transferencia de los embriones microinyectados.

13. En algunas ocasiones el infundíbulo no resulta claramente visible, con motivo del sangramiento relacionado con la ruptura de la membrana ovárica. En este caso, los embriones pueden ser depositados directamente en el ámpula que se perfora al efecto con la pipeta de transferencia, aunque este último método es considerablemente menos efectivo.

14. Libere el ovario de la posición en que se encontraba y ayudándose con pinzas romas introduzca nuevamente los órganos en el animal.

15. Suture la herida en 1 ó 2 planos. Deje al animal en reposo, hasta que se recupere del efecto del anestésico.

16. Repita los pasos aquí descritos si se desea transferir embriones al otro oviducto del animal.

La eficiencia de la transferencia de embriones microinyectados oscila entre 30 y 50 % (Hogan *et al.*, 1986; Petters *et al.*, 1987).

REFERENCIAS

- BRINSTER, R.L.; H.Y. CHEN; M.E. TRUMBAUER; M.K. YAGLE y R.D. PALMITER (1985). *Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442
- 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.; G.A. SCANGOS; D.J. PLOTKIN; J.A. BARBOSA y F.H. RUDDLE (1980). *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 77. N12. pp. 7380-7384.
- GORDON, J.W. y F.H. RUDDLE (1983). *Gene transfer into mouse embryos production of transgenic mice by pronuclear injection*. Methods in Enzymology 101: 411-413.
- HAMMER, R.E.; R.L. BRINSTER y R.D. PALMITER (1985). *Use of gene transfer to increase animal growth*. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biology 50: 379-387.
- HOGAN, B.F.; F. CONSTANTINI y E. LACY (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 viral 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. Vol 27. N 3. pp. 507-515.
- TOWNES, T.M.; J.B. LINGREL; H.Y. CHEN; R.L. BRINSTER y R.D. PALMITER (1985). *Erythroid-specific expression of human B-globin genes in transgenic mice*. EMBOJ. 4: 1715-1723.