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.

El proceso consta de diez pasos fundamentales:

- A partir de una suspensión celular con más del 95 % de viabilidad, se toma un volumen tal que contenga la cantidad de células necesarias para el experimento.
- La alicuota se centrifuga a 200 g durante siete minutos y se decanta el sobrenadante.
- El pellet se resuspende en un volumen pequeño, no mayor de 300 μl, en el cual la concentración quede ajustada a 3×10^6 cel/ml.
- Se añaden 100 μCi de Cr^{51} con no más de 27 días después de la fecha de referencia del radioisótopo.
- Se incuban durante una hora a 37°C, con movimiento rotacional (en roller) a dos rpm.
- Se lavan tres veces con medio de cultivo fresco, centrifugando a 200 g, durante 10 minutos, a 4°C.
- Se resuspenden en el volumen inicial.
- Se centrifugan a 200 g, durante 10 minutos, a 4°C y se decanta el sobrenadante.
- El pellet se resuspende en medio de cultivo fresco en un volumen que proporcione una concentración celular de 1×10^5 cel/ml.
- Por último, la suspensión de células marcadas se reparte en las correspondientes placas de microtitulación de fondo en "U", a razón de 100 μl por cada pocillo para dar lugar a la reacción de citotoxicidad.

COMENTARIOS

El aspecto más importante que se debe tener en cuenta en el proceso es el movimiento continuo de la suspensión celular durante el proceso de cromación. Cuando no hay movimiento de la suspensión celular, el nivel de incorporación del radionúclido es mucho más bajo, y la diferencia entre la liberación total de radioactividad y la liberada espontáneamente se hace menor.

Por el contrario, siguiendo el protocolo señalado anteriormente, los niveles de incorporación son mucho mayores y se garantiza una diferencia notable entre la radioactividad liberada de manera espontánea y la liberada totalmente. La liberación total corresponde a la incubación de las células blanco con SDS 0,5 %; por su parte, la espontánea se debe a las cpm liberadas por las K562 (Lozio, 1975) cuando son incubadas con medio de cultivo.

Esta diferencia entre ambos controles experimentales es importante en el cálculo de la actividad lítica específica de las células efectoras en cuestión.

En la tabla 1 se muestran dos ejemplos en los cuales el nivel de marcaje de la célula se favorece, en dependencia del método empleado.

Tabla 1

INCORPORACION DE Cr^{51} EN CELULAS K562(4)

	Liberación total	*Liberación espontánea*	*% LE/LT**
Con movimiento rotacional	6144 ± 2236	613 ± 15	10
Sin movimiento	902 ± 293	165 ± 47	18

*LE: Liberación espontánea; LT: Liberación total.
Los valores están dados en cpm.

REFERENCIAS

LAFRENIERE, R.; P. SPIESS y S.A. ROSENBERG (1984). *A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltring limphocytes.* Science **233**: 1318-1321

LOZIO, C.B. y B.B. LOZIO (1975). *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.* Blood, Vol. **45**: 321-33.

ROSENBERG, S.A.; S.L. SCHWARZ; S. SHU y J.J. MULE (1984). *Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin 2.* Science **225**: 1487-1489.

TIMONEM, T.; J.R. ORTALDO y R.B. HERBERMAN (1981). *Assay of augmentation of natural killer cell activity and antibody -dependent cell- mediated citotoxicity by interferon*, en: Methods of Enzymology. Vol. 79. Eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan, Academic Press, New York, pp. 477-484.