

# Capítulo 7

## Tinciones utilizadas en oocitos y embriones bovinos

**Autores:** Ariel Marcel Tarazona Morales, Juan Camilo Álvarez Balvín, Juliana Victoria Bedoya Jaramillo, Zulma Tatiana Ruiz Cortés.

La evaluación de oocitos y embriones bovinos mediante técnicas de tinción tiene gran relevancia para determinar los efectos que pueden tener las diferentes sustancias o condiciones utilizadas en los procesos de producción de embriones bovinos *in vitro* sobre la funcionalidad celular en diferentes estadios. En este capítulo se describen los procedimientos a realizar en algunas de estas técnicas.

### Montaje de embriones para tinciones fluorescentes

- **Propósito:** Indicar la metodología para el montaje de embriones en portaobjetos, conservando su morfología esférica para la evaluación de diferentes parámetros.

- **Materiales:** Láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo (ver capítulo 2), mezcla parafina-vaselina.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).

Procedimiento:

*Para la realización de la mezcla parafina-vaselina:*

- Pesar 2 gr de parafina y 40 gr de vaselina (1:10 p/p) en un beaker de 100 ml.
- Calentar la mezcla hasta que los componentes se disuelvan completamente y se incorporen.
- Colocar la mezcla líquida en jeringas de 5 o 10 ml y mantenerlas en refrigeración (ver figura 7.1).

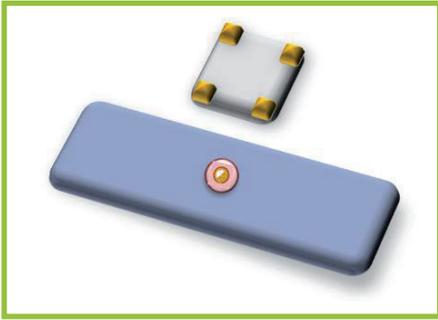


**Figura 7.1.** Jeringa con mezcla parafina-vaselina.

*Para el montaje de los embriones:*

- Marcar la lámina portaobjeto en uno de los extremos con marcador permanente, con la información del embrión que se desea evaluar.
- Preparar la laminilla cubreobjeto, colocando cuatro puntos de mezcla de parafina-vaselina en las cuatro esquinas para tener un espacio que evitará que el embrión pierda su forma y permitirá una mejor manipulación durante la observación bajo el microscopio de fluorescencia (ver figura 7.2).

*Nota:* Si se requiere un conteo de las células se debe ejercer una presión controlada sobre el cubreobjetos hasta que se rompa la zona pelúcida.



**Figura 7.2.** Preparación del montaje para evaluación de embriones.

- Poner una gota de 10  $\mu\text{l}$  de medio HEPES en la lámina portaobjeto, y en ella el embrión a evaluar. Poner encima la laminilla cubreobjeto previamente preparada y evaluar al microscopio.

*Nota:* En cada lámina portaobjeto se pueden evaluar hasta 10 embriones.

Para una mejor observación al microscopio, utilizar una punta o aguja para mover con pequeños toques el cubreobjeto, así el embrión puede girar para buscar el ángulo deseado de evaluación.

## Tinción de Hoechst para evaluación nuclear

- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo Hoechst.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES, Hoechst 33342 a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y adicionar 10  $\mu\text{l}$  de solución Hoechst de trabajo (10 mg/ml), luego incubarlos a 38,6  $^{\circ}\text{C}$  y 6%  $\text{CO}_2$  durante 5 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y el filtro azul.
- Los núcleos de las blastómeras emitirán fluorescencia azul y se verán redondos y ubicados al centro de la célula. Los resultados se expresan en número de núcleos (células) (ver figura 7.3).

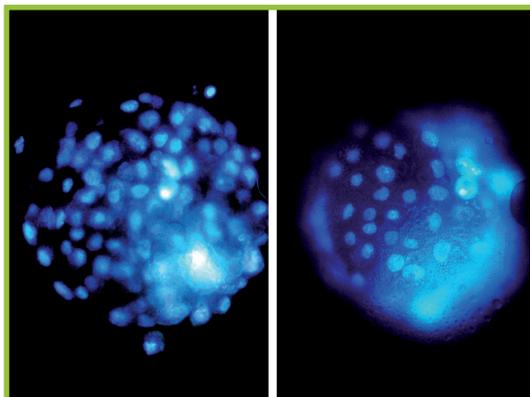


Figura 7.3. Embriones teñidos con Hoechst.

## Tinción con JC-1 potencial mitocondrial transmembranal

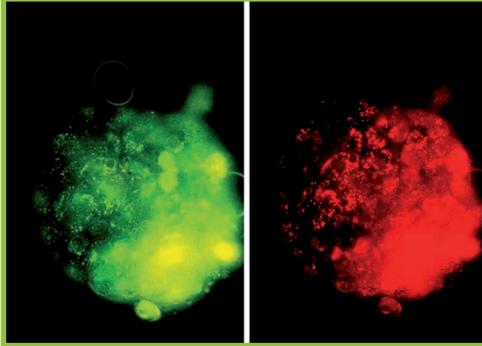
- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo JC-1.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución de tinción JC-1 a 7,5  $\mu\text{M}$  (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y 1  $\mu\text{M}$  de tinción cultivo JC-1 en el mismo medio, luego incubarlos a 38,6°C y 6%  $\text{CO}_2$  durante 25 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y los filtros para rodamina (BP 450-490, FT 510, LP 515) y fluoresceína (G 365, FT 395, LP 420).
- El control positivo se realiza con oocitos madurados *in vitro* incubados en medio de tinción (también se pueden usar células de granulosa); el control negativo se realiza incubando los embriones en medio de cultivo sin colorante.



- Las mitocondrias con alto potencial de membrana se observarán de color rojo (filtro 14) (ver figura 7.4 A) y las que tienen bajo potencial se observarán de color verde (filtro 09) (ver figura 7.4 B). Los resultados se expresan en porcentaje de coloración roja con respecto a los controles positivos.



**Figura 7.4.** A. Embrión con mitocondrias con alto potencial de membrana; B. Embrión con mitocondrias con bajo potencial de membrana.

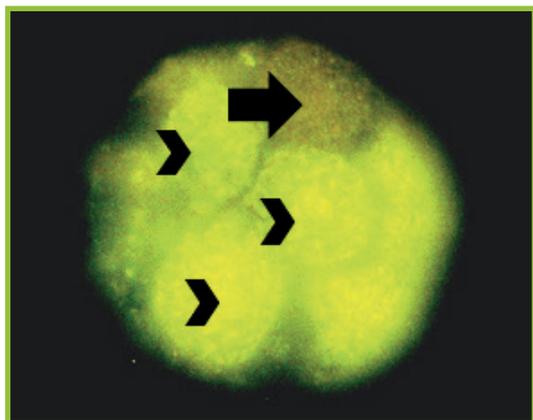
## Tinción con dihidro-rodamina (DHR) para evaluación de $H_2O_2$

- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo DHR.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, cabina de flujo laminar, estereoscopio, incubadora de  $CO_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo (ver capítulo 2), Solución DHR a 1 $\mu$ M.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu$ l HEPES de trabajo y 1  $\mu$ M de DRH en el mismo medio, luego incubarlos a 38,6°C y 6%  $CO_2$  durante 15 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia utilizando el filtro 09 (fluoresceína) en objetivo de 40X.

- El control positivo se realiza incubando los embriones en el medio de tinción a una concentración final en gota de incubación de  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; el control negativo se realiza incubando los embriones en gota de medio de cultivo sin DHR. Las células positivas se observarán de color verde intenso fluorescente, lo cual corresponde a aquellas que presentan acumulación intracelular de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados se expresan en porcentaje de células positivas.



**Figura 7.5.** Embrión con la tinción DHR. Se señalan las células positivas con punta de flecha, y se señala la célula negativa con flecha.

## Tinción con AO/EB para evaluación de apoptosis

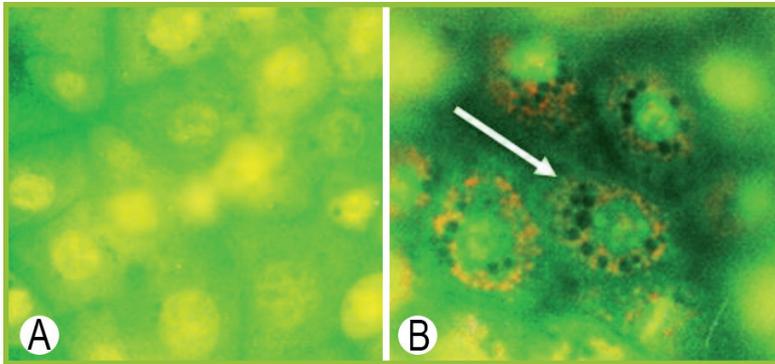
- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con los fluorocromos AC (Acridine Orange) y EB (Ethidium Bromide) AO/EB.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución AO/EB a  $5 \mu\text{M}$  (concentración final) (solución stock a 0,1 mg/ml) (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de  $50 \mu\text{l}$  HEPES de trabajo y  $5 \mu\text{M}$  de AO/EB en el mismo medio, luego incubarlos a  $38,6^\circ\text{C}$  y  $6\% \text{CO}_2$  durante 1 minuto.



- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia utilizando el objetivo de 40X.
- El control positivo se realiza incubando embriones en 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante toda la noche para inducir apoptosis; el control negativo se realiza usando embriones sincrónicos competentes de dos células. Para la lectura: las células normales (CN) presentan cromatina verde brillante, las células en apoptosis temprana (CAT) presentan cromatina altamente condensada o fragmentada verde brillante, las células en apoptosis tardía (CATA) presentan cromatina altamente condensada o fragmentada naranja brillante, y las células necróticas (CN) presentan cromatina naranja brillante (Leite et al, 1999) (ver figura 7.6). Los resultados se expresan en porcentaje de células apoptóticas, necróticas y viables.



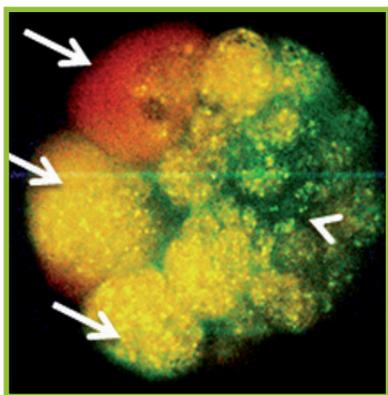
**Figura 7.6.** Tinción AO/EB. A. Embrión viable (células verde brillante); B. Embrión no viable (células naranja brillante). La flecha señala presencia de cuerpos apoptóticos.

## Evaluación de caspasas activas, tinción con Z-VAC-FMK

- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con el fluorocromo Z-VAC-FMK, con el fin de evaluar caspasas activas.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución Z-VAC-FMK a 1  $\mu\text{M}$  (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En la cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo y pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y 1  $\mu\text{M}$  Z-VAC-FMK en el mismo medio, luego incubarlos a 38,6°C y 6%  $\text{CO}_2$  durante 20 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y el filtro para fluoresceína.
- La FITC-VAD-fluorometilcetona Z-VAC-FMK es un inhibidor permeable para caspasas de amplio espectro (Zakeri, et al, 2005), que exhibe fluorescencia verde brillante en presencia de las caspasas activas 3, 6 y 9. Las células con baja activa de caspasas presentan coloración verde opaca o roja (inactivas) (ver figura 7.7). Los resultados se expresan en porcentaje de células con coloración positiva del total de células evaluadas.



**Figura 7.7.** Coloración de caspasas. Se señalan las células con caspasas positivas con punta de flecha, y se señalan las células con caspasas negativas con flecha.

## Tinción con naranja de acridina para celularidad

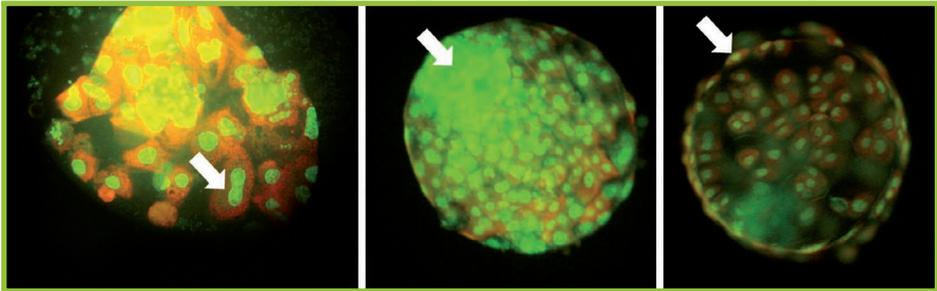
- **Propósito:** Indicar la metodología para la tinción de embriones u oocitos con los fluorocromos AC (Acridine Orange) y EB (Ethidium Bromide) AO/EB
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ .
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia, incubadora de  $\text{CO}_2$ .
- **Medios:** HEPES de trabajo, Solución de naranja de acridina de trabajo 5 $\mu\text{M}$  (concentración final) (solución stock a 0,1 mg/ml) (ver capítulo 2).



- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de flourocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones u oocitos del medio de cultivo, pasarlos a una caja de Petri con gotas de 50  $\mu\text{l}$  HEPES de trabajo y adicionar 10  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo de naranja de acridina (330  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), para una concentración final de 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , luego incubarlos a 38,6°C y 6% CO<sub>2</sub> durante 5 minutos.
- Realizar el montaje de los embriones (ver figura 7.2).
- Observar en fresco inmediatamente al microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40X y el filtro verde.
- Los núcleos de las blastómeras emitirán fluorescencia verde brillante y se verán redondos y ubicados al centro de la célula. Los resultados se expresan en número de núcleos (células) (ver figura 7.8).



**Figura 7.8.** Embriones teñidos con naranja de acridina. A. Se señalan los núcleos teñidos. B. Se señala la masa celular interna. C. Se señalan las células trofoectodermo.

## Técnica de túnel para la detección de apoptosis en embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar la técnica de marcaje *in situ* del ADN fragmentado en blastómeras de embriones bovinos.
- **Materiales:** Cajas de Petri de 60 mm, cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , nevera de poliestireno expandido (icopor), con hielo, recipiente oscuro, tubos de microcentrífuga de 0,5 ml, portaobjetos y cubreobjetos limpios, servilletas y tijeras.
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu\text{l}$ , cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia y platina térmica.

- **Medios:** Solución PBS + 0,025% PVP, paraformaldehído 4%, tritón X-100 al 0,5% (v/v) + citrato de sodio al 0,1% (w/v), buffer de equilibrio, enzima rTdT (deoxinucleotidil transferasa recombinante), Mix dUTPs (deoxinucleótidos conjugados con fluoresceína), SSC 2X, aceite mineral, Hoechst (10 µg/ml) (ver capítulo 2), solución antifade.
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

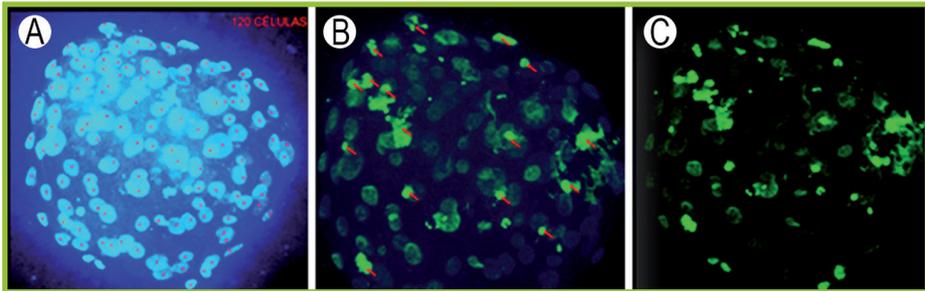
- Sacar los embriones del medio de cultivo y realizar un doble lavado en gotas de 50 µl de PBS + 0,025% PVP (1 minuto por cada gota).
- Fijar los embriones en una gota de 50 µl de paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4°C. Repetir el paso 1.
- Después de la fijación de los embriones, estos pueden ser guardados en el medio de lavado a 4°C por un período de tres semanas. En caso contrario, continuar con el proceso.
- Someter los embriones a un proceso de permeabilización, ponerlos en una solución de tritón X-100 al 0,5% (v/v) + citrato de sodio al 0,1% (w/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Repetir el paso 1.
- Poner los embriones en una gota de 50 µl de solución buffer de equilibrio (Be) por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir los embriones a una gota de 50 µl del mix de reacción, cubrir con aceite mineral e incubar a 37°C por 1 hora en condiciones de completa oscuridad.
- Sacar los embriones de la solución de incubación y transferirlos a una gota de 50 µl de SSC 2X por 15 minutos a temperatura ambiente. Repetir el paso 1.
- Poner los embriones en un portaobjetos y adicionar 10 µl de Hoechst ([w] = 10 µg/ml) por 1 minuto, retirar el exceso de Hoechst y lavar con PBS + 0,025% PVP, retirar el exceso de medio de lavado, adicionar 10 µl de solución antifade y colocar el cubreobjetos (ver figura 7.2).
- Observar en microscopio de epifluorescencia teniendo en cuenta las longitudes para la fluoresceína (520 ± 20 nm) y el Hoechst (emisión a 352 nm y excitación a 455 nm). Realizar registro fotográfico con cada filtro para su posterior conteo (ver figura 7.9).
- El control positivo se realiza efectuando los pasos 1, 2, 3 y 4 del protocolo de túnel. Posteriormente, incubar los embriones en una solución de DNasa tipo I (50 U/ml) a 37°C por 1 hora en condiciones de completa oscuridad. Llevar los embriones a una gota de medio de lavado y continuar con el paso 5 (ver figura 7.10 A). El control



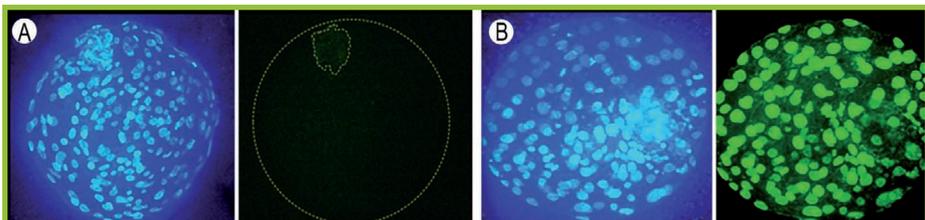
negativo se realiza siguiendo los pasos del protocolo de túnel, pero omitiendo la adición de la enzima rTdT durante la preparación del mix de reacción (ver figura 7.10 B).

## Doble tinción con Hoechst/Ioduro de Propidio para la viabilidad embrionaria

- **Propósito:** Indicar la técnica de doble tinción con Hoechst 33342 e ioduro de propidio para realizar un conteo diferencial de células viables y células muertas.
- **Materiales:** Cajas de Petri de 35 mm, puntas para las micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, portaobjetos y cubreobjetos limpios, servilletas y tijeras.
- **Equipos:** Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l, cabina de flujo laminar, estereoscopio, microscopio de epifluorescencia y platina térmica.
- **Medios:** PBS + 0,025% PVP, Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/ml), ioduro de propidio (0,05 mg/ml), solución antifade (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y medidas de seguridad para manipulación de fluorocromos (ver capítulo 1).



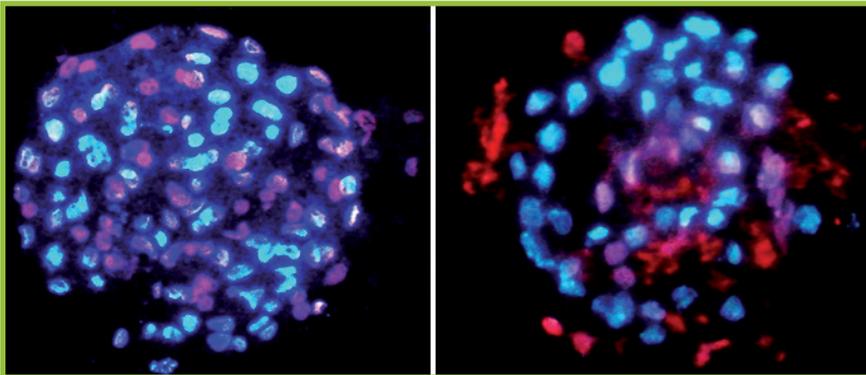
**Figura 7.9.** Tinción técnica TUNEL A. Presenta el conteo celular basado en una tinción de contraste con Hoechst; B. Corresponde a una fusión del registro fotográfico captado con dos filtros diferentes, empleada para verificar las células positivas para TUNEL; C. Muestra los puntos en el embrión donde se evidencia la incorporación de nucleótidos con jugados con fluoresceína (verde fluorescente). El índice de apoptosis se obtiene dividiendo la cantidad de células positivas para TUNEL sobre el total células del embrión.



**Figura 7.10.** A. Control negativo de la técnica de TUNEL (bloqueo de la incorporación de nucleótidos mediante la omisión de la enzima rTdT durante la incubación con el mix de reacción). B. Control positivo de la técnica de TUNEL (fragmentación general en las blastómeras inducido por la acción de una DNasa tipo I).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Sacar los embriones del medio de cultivo y realizar un doble lavado en gotas de PBS + 0,025% PVP (1 minuto por cada gota).
- Tomar un embrión con un volumen de 10  $\mu$ l de medio de lavado y ubicarlo en el portaobjetos previamente marcado. Retirar el exceso de medio y adicionar 10  $\mu$ l de solución Hoechst (10  $\mu$ g/ml) por un minuto. Mantener la muestra alejada de la luz directa.
- Retirar el Hoechst y adicionar 10  $\mu$ l de solución PBS + 0,025% PVP, realizar un pipeteo suave sin perder de vista el embrión. Retirar el medio de lavado.
- Adicionar 10  $\mu$ l de yoduro de propidio (0,05 mg/ml) por un minuto. Tener en cuenta las recomendaciones del paso 2.
- Retirar el exceso de yoduro de propidio y proceder al lavado indicado en el paso 3. adicionar 10  $\mu$ l de solución antifade y colocar el cubreobjetos (ver figura 7.2).
- Observar en microscopio de epifluorescencia empleando un filtro en capacidad de leer la intensidad de ambos fluorocromos: Hoechst (emisión a 352 nm y excitación a 455 nm) y el yoduro de propidio (emisión a 338 nm y excitación a 617 nm).



**Figura 7.11.** Ambos fluorocromos se intercalan en el ADN. El Hoechst ingresa a todas las células, pero el yoduro de propidio sólo entra en las células muertas o necróticas (con daño en membrana).



## Bibliografía recomendada

- Leite M, Quinta CM, Leite PS, Guimarães JE (1999), Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60, *Anal. Cell Pathol*, 19(3-4): 139-151.
- Zakeri Z, Lockshin RA, Criado-Rodríguez LM, Martínez AC (2005) A generalized caspase inhibitor disrupts early mammalian development, *Int. J. Dev. Biol*, 49: 43-47.

