

EXPERIMENTAL PROTOCOL: Procedimientos experimentales para modelos de leucemia y seguimiento de la enfermedad

Author/s: Alba Martínez Moreno

Contact info: amartinezm@carrerasresearch.org

Cepas usadas y consideraciones a tener en cuenta

- NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ (005557) para LLA.
- NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1WjlTg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ (013062) para LMA.
- Edad: 7-12 semanas.
- Sexo: ambos.
- Acondicionamiento previo al trasplante: Mieloblación por irradiación corporal total a dosis sub letal 2Gy unas 4-16 horas antes del trasplante.
- Se recomienda realizar tratamiento profiláctico con Enrofloxacin 0,1% en agua de bebida para evitar infecciones secundarias.

Trasplante intratibia

- Material: talla quirúrgica, manta térmica, jeringuillas 0,5 ml insulina 29G, clorhexidina en spray, rasuradora, crema depilatoria, bastoncillos, lubrithal 10g, jeringuilla 1ml, agujas 25G, gasas estériles.
- Analgesia: Requerida, vía subcutánea. 30 min antes de la intervención y cada 8-12h durante 48h. Según estado, aplicar también a las 72h. Consultar siempre el/la veterinario/a designado/a. Buprenorfina 0,1mg/Kg a 0,03mg/ml y Meloxicam 2mg/Kg a 0,5mg/ml.
- Anestesia: Requerida, vía inhalatoria. Isoflurano: inducción a 5% ISO+0,8L/min O₂ y mantenimiento a 2% ISO+0,8L/min O₂.

Procedimiento:

- Identificación de los ratones, pesaje y administración de la analgesia.
- Anestesiarse mediante la cámara de inducción.
- Aplicar lágrima artificial (lubrithal 10g).
- Posicionar al ratón decúbito supino en la camilla de anestesia sobre la manta térmica y asegurar de que el animal está en plano profundo por pérdida de reflejo podal.
- Depilación de la pata a trasplantar: Rasurar la pata, aplicar crema depilatoria durante 45-60 segundos para evitar lesiones y retirar con la ayuda de una gasa.

- Desinfección de la zona rasurada con clorhexidina.
- Situar la extremidad en un ángulo de 90º sujetándola con el dedo índice y gordo. Localizada la tibia, se perforará la meseta de la rodilla con una jeringuilla con una aguja de 25G para entrar en la tibia. La aguja se tiene que posicionar perpendicular al hueso. Puede rotarse suavemente la aguja para facilitar la perforación. Para asegurar que la aguja se encuentra dentro de la tibia, soltar la pierna y rotar ligeramente la jeringuilla. Si toda la pierna gira al mismo tiempo que la jeringuilla, estamos dentro.
- Se retirará la aguja de 25G cuidadosamente y se introducirá por el mismo orificio la aguja de 29G precargada con un máximo de 20ul de la suspensión celular. Inocular muy lentamente, esperar unos segundos y retirar.
- Sacar el animal de la camilla y dejar recuperar de la anestesia encima de la manta térmica. Una vez recuperado, devolver a su jaula.
- A partir de ese momento se realizará un seguimiento de los ratones, controlando su comportamiento y apariencia para supervisar posibles signos de dolor como consecuencia de la irradiación y/o trasplante.

Trasplante intravenoso

- Material: clorhexidina en spray, jeringuilla 1ml, agujas 25G, gasas estériles, inmovilizador con luz (mouse tail illuminator de bioseb).
- Analgesia: No requerida.
- Anestesia: No requerida.

Procedimiento:

- Se procederá a inducir la vasodilatación de la vena lateral para facilitar su canulación. Para ello, se desinfecta la cola con clorhexidina y se deja reposar en la zona habilitada para ello evitando causarle quemaduras por exposición excesiva.
- Una vez localizada la vena lateral, se procede a inyectar la muestra con una aguja de 25G de forma prácticamente paralela a la superficie de la cola del ratón. Se sabe que la aguja está en el lumen de la vena cuando no hay resistencia al presionar el émbolo.
- Una vez inoculada la muestra, se retirará la aguja y se presionará la zona de inyección con un algodón para detener la hemorragia y así evitar la aparición de hematomas.
- El volumen máximo no superará los 200ul.

Seguimiento de la enfermedad

Monitorización del porcentaje de células trasplantadas a partir de:

1-Sangrado por punción en la vena submandibular:

Para ello, se procederá a la extracción de 20µl de sangre por punción en vena facial para evaluar el porcentaje de células leucémicas circulantes en sangre periférica mediante citometría de flujo.

- Material: tubos EDTA K, lancetas estériles o agujas 21G, gradilla y gasas.
- Analgesia: No requerida.
- Anestesia: No requerida.
- Volumen máximo de recolección: Según frecuencia de sangrado, un 10% del volumen de sangre circulante sobre las 3-4 semanas.

Procedimiento:

- Se inmovilizará firmemente al ratón consciente de manera que la cabeza quede alineada con el cuerpo, es decir, que no esté inclinada hacia el tórax o hacia los lados.
- Se compimirá ligeramente los vasos del cuello del lado opuesto a la punción. Esto dificultará temporalmente el retorno venoso yugular y facilitará el sangrado. Hay que tener la precaución de que el animal continúe respirando sin dificultad.
- Se localizará el plexo facial (pequeña zona circular desprovista de pelo) situada centralmente en la mandíbula inferior.
- Se procederá a la punción submandibular mediante una lanceta estéril o aguja de 21G, con la punta de la misma paralela a la superficie de la piel y nunca profundizando más de 4-5mm.
- Tras la punción, la sangre se recogerá por goteo dentro de un tubo EDTA K. El flujo será de aproximadamente una gota (20µl) por segundo.
- Una vez recogido el volumen necesario, se dejará al animal. En ese momento, la sangre dejará de fluir. No obstante, para prevenir un sangrado prolongado se hará presión con una gasa estéril durante unos segundos en la zona de punción.

-Biopsia por aspirado de médula ósea:

Una vez se haya detectado presencia de células leucémicas en sangre periférica (5%), se confirmará la presencia de injerto a nivel medular a través de una biopsia por aspirado de médula ósea, siendo realizada como máximo 2 veces en todo el procedimiento y con 4 semanas entre aspirados.

- Material: talla quirúrgica, manta térmica, jeringuillas 0,5 ml insulina 29G, tubos eppendorfs, clorhexidina en spray, rasuradora, crema depilatoria, bastoncillos, lubrithal 10g, jeringuilla 1ml, agujas 25G, gasas estériles.

-Analgésia: Requerida, vía subcutánea. 30 min antes de la intervención y cada 8-12h durante 48h. Según estado, aplicar también a las 72h. Consultar siempre el/la veterinario/a designado/a. Buprenorfina 0,1mg/Kg a 0,03mg/ml y Meloxicam 2mg/Kg a 0,5mg/ml.

-Anestesia: Requerida, vía inhalatoria. Isoflurano: inducción a 5% ISO+0,8L/min O₂ y mantenimiento a 2% ISO+0,8L/min O₂.

Procedimiento:

- Pesar y administrar analgesia.
- Añadir a cada eppendorf 10ul de PBS estéril.
- Anestésiar mediante la cámara de inducción.
- Aplicar lágrima artificial (lubrithal 10g).
- Posicionar al ratón decúbito supino en la camilla de anestesia sobre la manta térmica y asegurar de que el animal está en plano profundo por pérdida de reflejo podal.
- Depilación de la pierna a trasplantar: Rasurar la pata, aplicar crema depilatoria durante 45-60 segundos para evitar lesiones y retirar con la ayuda de una gasa.
- Desinfección zona rasurada con clorhexidina.
- Situar la extremidad en un ángulo de 90º sujetandola con el dedo índice y gordo. Localizada la tibia, se perforará la meseta de la rodilla con una jeringuilla con una aguja de 25G para entrar en la tibia. La aguja se tiene que posicionar perpendicular al hueso. Puede rotarse suavemente la aguja para facilitar la perforación. Para asegurar que la aguja se encuentra dentro de la tibia, soltar la pierna y rotar ligeramente la jeringuilla. Si toda la pierna gira al mismo tiempo que la jeringuilla, estamos dentro.
- Se retirará la aguja de 25G cuidadosamente y se introducirá por el mismo orificio la aguja de 29G precargada con 5-10ul de PBS estéril.
- Inyectar un pequeño volumen y aspirar el contenido de la médula.
- Sacar el animal de la camilla y dejar recuperar de la anestesia encima de la manta térmica. Una vez recuperado, devolver a su jaula.
- A partir de ese momento se realizará un seguimiento de los ratones, controlando su comportamiento y apariencia para supervisar posibles signos de dolor como consecuencia de la irradiación y/o trasplante.

-Mediante imágenes in vivo por bioluminiscencia:

En caso de haber trasplantado con células con expresión de GFP.

-Material: jeringuillas 1ml, jeringuilla 1ml, agujas 27G, luciferina previamente alicuotada y atemperada a 150mg/kg, Xenogen IVIS 50 Imaging System (PerkinElmer).

-Analgésia: No requerida.

-Anestesia: Requerida, isoflurano: Inducción a 5% ISO+0,8L/min O₂ y Mantenimiento a 2% ISO+0,8L/min O₂.

Procedimiento:

- Administrar 100ul de luciferina intraperitoneal y esperar 5 min*.
- * El tiempo de espera variará según la cinética previa para cada modelo.
- Anestesiarse los ratones y colocar en el IVIS decúbito prono (según experimento valorar otras posiciones).
- Obtención de las imágenes para su posterior cuantificación.

Trasplante células leucémicas (LLA, LMA) — { Para líneas celulares, NO IRA, Trasplante IV
 { Para células de muestras primarias, IRA 2Gy, Trasplante IT

