



Universidad de Valladolid

**Facultad de Ciencias de la Salud.
Grado en Medicina**

Trabajo Fin de Grado

Curso 2016-2017

**Técnicas de cultivo de
embriones de pollo: realización
de un video didáctico.**

AUTORES :

- Sarai Palacios González

TUTOR:

- D. José Antonio Moro Balbás

ÍNDICE:

- **INTRODUCCIÓN** Página 3
- **MOTIVACIÓN** Página 3
- **OBJETIVO** Página 3
- **MATERIAL Y METODOS** Página 4
- **DESARROLLO DEL TRABAJO** Página 7
- **APLICACIONES** Página 16
- **BIBLIOGRAFÍA** Página 18

INTRODUCCIÓN

La embriología es la ciencia biológica que estudia el desarrollo prenatal de los organismos y trata de comprender y dominar las leyes que lo regulan y rigen. Si bien es cierto que ya conocemos el desarrollo célula a célula de un embrión, la ciencia avanza a pasos de gigante y trata de ir más allá. En este caso estamos hablando del futuro de la investigación sobre posibles sustancias que modifiquen ese desarrollo normal, a través de la microinyección de dichas sustancias a estudiar en el embrión, pudiendo comprobar empíricamente los efectos que estas producen, ayudando así a entender el proceso, evitarlo, o incluso utilizarlo a nuestro favor cuando así se requiera.

MOTIVACIÓN

A lo largo de estos seis años estudiando medicina mis intereses se han ido perfilando.

El campo de la investigación siempre me ha llamado la atención, así como la forma de cada profesor de enseñar todos los contenidos que he ido aprendiendo. Es por esto por lo que decido escoger este proyecto, ya que engloba por un lado el abordaje didáctico de un material que de forma longeva se va a utilizar para enseñar conceptos a diversos alumnos, y por otro lado el propio contenido de dicho material, que se me presenta como innovador y con unas aplicaciones excepcionales para el futuro en la práctica médica.

Esta elección es por tanto el resultado de las ganas de saber más, de crear material audiovisual para su futuro uso en la Facultad, y de la propia voluntad de realizar un vídeo, ya que los procesos de grabar y editar siempre han sido parte de mis intereses a nivel personal.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo de fin de grado es principalmente la realización de un vídeo didáctico para su ulterior utilización a la hora de enseñar a los alumnos que cursen alguna de las siguientes asignaturas:

- Biología del desarrollo y teratología, impartida como optativa en segundo curso de medicina
- Abordajes experimentales del desarrollo del sistema nervioso, impartida en el Máster de investigación biomédica.

Se trata por tanto de un objetivo didáctico para complementar las enseñanzas teóricas de dichas asignaturas de un modo más visual y práctico, ayudando así a entender a los alumnos los conceptos explicados.

Más allá de este fin, se ha realizado este proyecto con el segundo objetivo de implementar los materiales audiovisuales de los que se disponía hasta el momento, es decir, se ha realizado un vídeo que pudiera sustituir al que se venía utilizando anteriormente, tratando de que el nuevo proyecto superase al antiguo en cuanto a calidad audiovisual se refiere.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de elaborar la descripción de este trabajo, se va a dividir el contenido del apartado en tres segmentos:

- 1- Diseño del proyecto audiovisual
- 2- Obtención del material audiovisual
- 3- Montaje, edición y masterización del proyecto audiovisual.

1- Diseño del proyecto audiovisual

Para la realización del diseño del video que se presenta, se ha contado con la gran ayuda del tutor del proyecto: José Antonio Moro, quien colaboró proporcionando un esquema de las distintas tomas que debería incluir el mismo, así como guiándonos a la hora de utilizar el material con el que se llevaron a cabo los cultivos y la manipulación de los huevos fecundados.

2- Obtención del material audiovisual

Durante esta fase, fueron necesarias alrededor de trece horas de trabajo, llevadas a cabo en el Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina,

quien nos proporcionó todo el material necesario, así como los huevos de pollo fecundados.

El proceso engloba tanto tomas macroscópicas del proceso, como tomas microscópicas, realizadas con un estereomicroscopio. Al mismo tiempo, se fueron tomando fotografías de todo el proceso.

Para las tomas macro en vídeo se usó la cámara SONY HANDYCAM DCR-SR37E (Figura 1), y para las tomas micro se utilizó la cámara NIKON COOLPIX 990(Figura 2), adjuntada al microscopio estereoscópico SMZ800 (Figura 3) disponible en el laboratorio de embriología experimental del departamento de Anatomía.

Para tomar las fotografías macroscópicas del proceso se utilizó la cámara CANON EOS 70D(Figura 4).



Figura 1



Figura 2

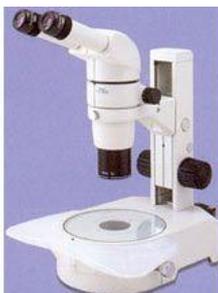


Figura 3



Figura 4

Más allá del material audiovisual requerido para el proyecto, se necesitó también instrumental para la realización de los procesos que aquí se definen: Elaboración del medio de cultivo para el embrión de pollo y obtención de los embriones.

1- Para la elaboración del medio de cultivo:

- Para garantizar la esterilidad: Autoclave, Campana de flujo laminar, cámara comercial de cultivo estéril

-Preparación de cámara de cultivo no comercial: Placa de Petri de vidrio, Vidrio de reloj, algodón.

-Ingredientes: Ringer estéril, bactoagar, huevo no fecundado.

-Complementos: Filtros millipore 0.22cm, parafilm, algodón, agitador magnético, Centrifugadora, incubadora, frigorífico, pipeta Pasteur, tubo calibrado estéril, probetas, tubos de ensayo, vasos de precipitado, termómetro, varilla estéril, recipientes con agua destilada.

2- Manipulación de los embriones (obtención de embriones, transferencia al medio de cultivo):

Portahuevos, boll, placa de Petri, pinzas acodadas, tijeras curvas, elevador, Ringer, jeringa estéril, pinzas de relojero (Figura5).



Figura 5

3. Montaje, edición y masterización del proyecto audiovisual.

Una vez obtenido todo el material audiovisual necesario, se procedió a su montaje. Para ello, se ha utilizado principalmente el programa de edición de vídeo Sony Vegas Pro 13.0, aunque también se procedió al retoque de luz con la ayuda del programa de edición de vídeo Adobe Premiere. Cuando las tomas de vídeo estuvieron montadas en orden se procedió a la grabación del guión de

voz, previamente confirmado por el tutor, con el uso de los auriculares con micrófono integrado EarPods, de Apple.

Esta parte ha sido la más laboriosa del trabajo, sumando alrededor de 30 horas de trabajo totales, ya que el video se tuvo que editar varias veces, según se iba corrigiendo progresivamente con el tutor, quien iba proponiendo mejoras al proyecto, y a su vez también se tuvo que masterizar para que el sonido quedara plenamente integrado. La música utilizada para el proyecto ha sido obtenida a través de la página web "<http://freemusicarchive.org>", encargada de proporcionar audios para su libre utilización sin derechos reservados.

DESARROLLO DEL TRABAJO

Para realizar el cultivo de embriones de pollo seguiremos los siguientes pasos:

- 1°. Preparación de la cámara de cultivo y elaboración del medio de cultivo.
- 2°. Obtención de los embriones de pollo.
- 3°. Preparación del cultivo.
- 4°. Extracción del embrión del medio de cultivo.

Preparación de la cámara de cultivo y elaboración del medio de cultivo:

Todo nuestro trabajo lo realizamos en una campana de flujo laminar (Figura 6), dicha campana permite mantener la atmósfera del volumen interior del área de trabajo estéril, impidiendo el paso de partículas de polvo y contaminación, consta de tres paredes de cristal, tal como se ve en la fotografía (Figura 7).

Por otro lado todo el material necesario para la realización del cultivo debe ser esterilizado previamente en autoclave o bien emplear material estéril de un solo uso.

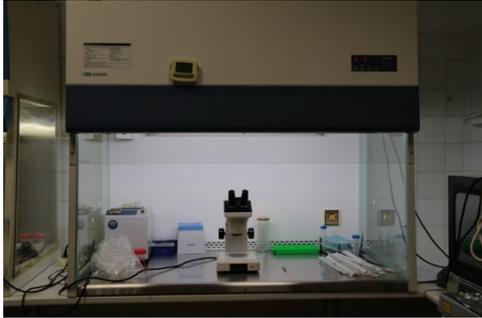


Figura 6



Figura 7

Para empezar preparamos el medio de cultivo, para ello vertimos un huevo no fértil en un vaso de precipitados de 200 cc y agitamos con una varilla estéril hasta obtener un homogeneizado .

Ahora procedemos a la esterilización de la solución Ringer, para ello usamos jeringas de 20 cc y filtros milipore de 0,22 micrómetros de poro y vamos vertiendo el ringer estéril en un vaso de precipitados (Figura 8).



Figura 8

Una vez que tenemos ambos componentes (el Ringer y el homogenizado de huevo) procedemos a su mezcla, echando por partes iguales (50 cc cada uno) en otro vaso de precipitados de 200 cc hasta obtener una mezcla homogénea(Figura 9 y 10).



Figura 9



Figura 10

En el siguiente paso vertemos el contenido de la mezcla en tubos de ensayo estériles y los tapamos con parafilm,(Figura 11) a continuación los introducimos en la centrifugadora a 1800 r.p.m durante 1 hora.



Figura 11

Una vez hecho esto recogemos el sobrenadante con una pipeta Pasteur y lo almacenamos en tubos de ensayo calibrados a 37 °(estériles y con tapón de rosca)(Figura 12,13,14,15).



Figura 22



Figura 13



Figura 14



Figura 15

Ahora vamos preparando la solución Agar para ello: Disolvemos 1,5 gramos de Bactoagar en 100 cc de Ringer estéril y lo calentamos hasta alcanzar la ebullición, durante este proceso la solución es sometida a agitación constante con ayuda de un agitador magnético (Figura 16).

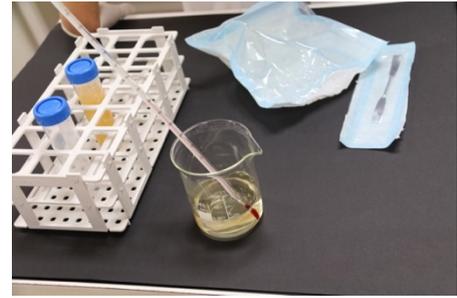


Figura 16

Tras la ebullición el preparado de agar debe estar totalmente disuelto y presentar un aspecto transparente, si presenta grumos debe de ser desechado. Esta solución se debe de enfriar hasta una temperatura en torno a los 40°C

Por último para completar este paso mezclamos a partes iguales (100 cc cada uno) bactoagar ya disuelto a 37 grados y la mezcla de homogenizado de huevo-ringer y revolvemos con una varilla estéril.

Ahora preparamos la cámara de cultivo, para llevar a cabo el cultivo se pueden emplear cámaras comerciales de cultivo estériles y de un solo uso. Estas cámaras presentan un disco central sobre el que se depositará el medio de cultivo y un anillo periférico que se rellena con solución de Ringer estéril para mantener un alto grado de humedad en la cámara(Figura 17).

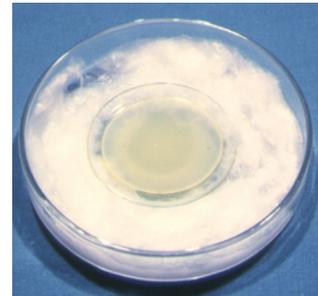


Figura 17

En caso de no disponer de cámaras de cultivo comerciales las supliremos de la siguiente forma : necesitamos una placa de Petri, algodón, Ringer estéril , un vidrio de reloj y el medio de cultivo obtenido anteriormente.

Primero colocamos un anillo de algodón alrededor de la placa de Petri, a continuación lo mojamos con el ringer estéril (es necesario empaparlo en ringer para conseguir un elevado grado de humedad relativa durante el cultivo y de esta forma evitar la desecación del embrión)y colocamos el vidrio de reloj, por último vertemos el medio de cultivo obtenido en el paso anterior en el centro del vidrio de reloj.

Obtención de los embriones de pollo.

Para obtener los embriones nos dirigimos a la incubadora, donde se mantienen a 37,5° con un alto grado de humedad relativa , que se consigue con un deposito de agua destilada .

Los huevos están colocados horizontalmente porque los embriones se localizan siempre en la parte superior del huevo (Figura 18)



Figura 18

El tiempo de incubación depende del estadio en el que queramos obtener el embrión , en nuestro caso están entre los estadios 18 a 20 de Hamburger y Hamilton lo que supone un tiempo de incubación de entre 65 a 72 horas (Tabla 1) (Figura 19).

		Estadio embrionario
1		
2	6-7 hr	Línea primitiva inicial 0,3-0,5 mm largo
3	12-13 hr	Línea primitiva intermedia
4	18-19 hr	Línea primitiva definitiva 1.88 mm largo
5	19-22 hr	Notocorda
6	23-25 hr	Frecuentemente ya se observa la cabeza
7 a 8	23-26 hr	1 somite y pliegues neurales
8	26-29 hr	4 somitas, islas de sangre
9	29-33 hr	7 somitas, vesículas ópticas primarias
9 -10	33 hr	8-9 somitas pliegue amniótico anterior
10	33-38 hr	10 somitas , 3 vesículas cerebrales primarios.
11	40-45 hr	13 somitas, 5 neurómeros en romboencéfalo.
12	45-49 hr	16 somitas, telencéfalo

13	48-52 hr	19 somitas, canal auriculoventricular
14	50-53 hr	22 somitas, flexion del tronco, arcos viscerales I y II
15	50-55 hr	24-27 somitas, arco visceral III
16	51-56 hr	26-28 somitas pliegue amniótico posterior
17	52-64 hr	29-32 somitas, brote de pata, epífisis.
18	3 día	30-36 somitas, alantoides
19	3-3,5 días	37-40 somitas, proceso maxilar
20	3-3,5 días	40-43 somitas, rotación completa, pigmento de los ojos
21	3,5 días	43-44 somitas, IV arco
22	3,5 -4 días	Los somitas se extienden hasta la punta de la cola
23	4 día	Contorno craneo-caudal
24	4,5 días	Placa de las patas
25	4,5-5 días	Codo y articulaciones de las rodillas
26	5 días	1-3 dedos de la pata
27	5-5,5 días	pico
28	5.5-6 días	4 dedos pata
29	6-6.5 días	Quinto dedo de la pata
30	6.5-7 días	Papila escleral
31	7-7.5 días	1-2 dedos
32	7,5 días	Termina la morfogénesis de la mandíbula y el pico
33	7,5-8 días	Margen radial de ala
34	8 días	Membrana nictitante

Tabla 1.

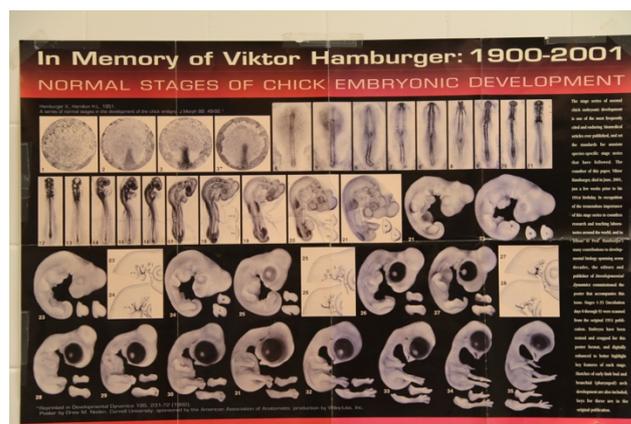


Figura 19

Hay dos posibles formas de extraer el embrión : En la primera rellenamos con solución Ringer a 37°C un boll y una placa de Petri y seguidamente vertemos el

contenido de un huevo fértil en el boll con Ringer. En este momento se puede apreciar el embrión en la parte superior del vitelo o yema, también se observa el área vascular en torno al embrión, en esta área se produce la absorción de los elementos nutritivos del vitelo que se transfieren al embrión a través de los vasos vitelinos. Puede verse con claridad el latido cardiaco.

A continuación sujetamos la yema con unas pinzas acodadas y procedemos a recortar con una tijeras curvas la membrana vitelina, lo más alejado posible del área vascular y con cuidado de no dañar ningún vaso. Una vez recortada el área vitelina colocamos el embrión con su área vascular sobre un elevador, arrastrándolo con las pinzas y lo transferimos a una placa de Petri con solución de Ringer a 37°C.

Otra forma de extraer los embriones sobre todo en estadios tempranos, , (y la que hemos utilizado nosotros) es la siguiente: colocamos el huevo fértil e incubado en un soporte, en posición horizontal, en la misma orientación que tenía en la incubadora

. Seguidamente hacemos un pequeño orificio en la parte ancha del huevo con ayuda de unas tijeras Extraemos con una jeringa la clara (Figura 20) y lo abrimos con unas tijeras , a continuación recortamos la membrana vitelina con una tijera curva y unas pinzas acodadas conservando el área vascular (Figura 21) . Una vez recortada el área vitelina colocamos el embrión con su área vascular sobre un elevador (Figura 22), arrastrándolo con las pinzas y lo transferimos a una placa de Petri con solución de Ringer a 37°C.



Figura 20



Figura 21



Figura 22

Lo transportamos con un elevador a una placa de Petri con solución ringer (Figura 23).

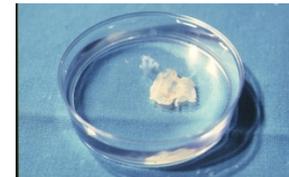


Figura 23

Eliminamos el ringer para poder ver mejor el área vascular del embrión (Figura 24 y 25).

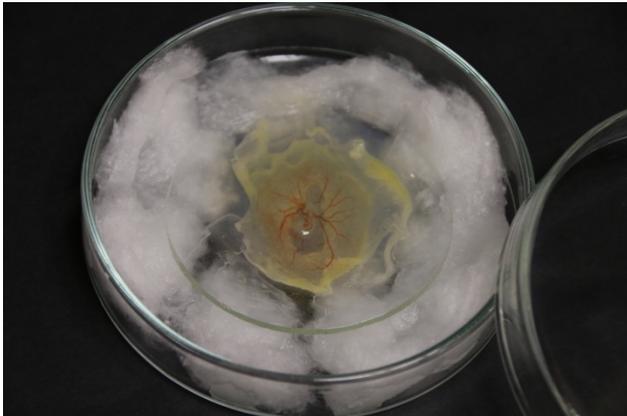


Figura 24



Figura 25

Preparación del cultivo.

Antes de iniciar el cultivo, se deben de introducir las cámaras de cultivo en la estufa de incubación para que estas alcancen una temperatura de 37°C.

En primer lugar depositamos sobre el medio de cultivo una pequeña cantidad de solución de Ringer con una pipeta Pasteur. Seguidamente recogemos al embrión de la placa de Petri en la que lo habíamos depositado tras su

aislamiento del huevo, para esto sujetamos con una pinzas por fuera de los vasos y transferimos al embrión a un elevador y luego lo transportamos a la placa de cultivo, depositando el elevador sobre el medio, teniendo cuidado de no alterar la superficie del mismo. Con unas pinzas acodadas tiramos suavemente por fuera del área vascular y vamos retirando el elevador hasta que el embrión y el área vascular queden suspendidos sobre la superficie del medio de cultivo. Por último, con unas pinzas de relojero, estiramos perfectamente el área vascular, procurando que no queden pliegues o arrugas en la misma, ya que esto alteraría el desarrollo y crecimiento del embrión. A continuación se retira el Ringer que habíamos depositado sobre la superficie del medio, absorbiendo cuidadosamente con una pipeta Pasteur, por fuera del área vascular.

Colocamos nuestro embrión en el esteromicroscopio y vemos como el corazón de nuestro embrión sigue latiendo y como se conserva el área vascular. Una vez hecho esto introducimos nuestra cámara de cultivo en la incubadora durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas comprobamos que ha experimentado un notable crecimiento habiendo alcanzado el estadio 22 de Hamburger y Hamilton. Este es el estadio máximo que podemos alcanzar con esta técnica de cultivo (Figura 26 y 27) . Puede observarse que el esbozo ocular presenta ya abundante pigmentación y el alantoides está intensamente vascularizado.

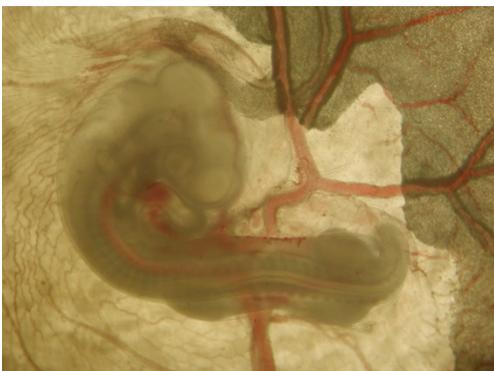


Figura 26

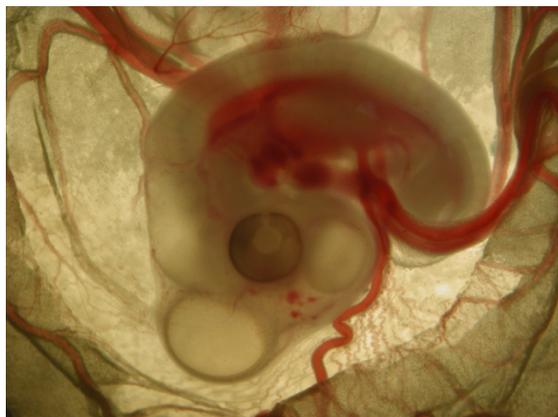


Figura 27

Extracción del embrión del medio de cultivo.

Por último procedemos a la extracción del embrión del medio de cultivo, primero depositamos ringer sobre dicho medio y a continuación despegamos el embrión y su área vascular con unas pinzas de relojero. A continuación lo recogemos con el elevador y lo pasamos a otra placa de Petri que tiene Ringer LIMPIO A 37 °.

Comprobamos que el desarrollo embrionario es normal, aunque con relativa frecuencia se pueden observar pequeñas alteraciones en el proceso de rotación del tronco, sobre todo si el cultivo se inicia en fases tempranas del desarrollo embrionario.

APLICACIONES DE LA TECNICA DE CULTIVO

Microinyección embrionaria de diferentes compuestos en áreas muy concretas del embrión (Figura 28, 29 y 30).



Figura 28

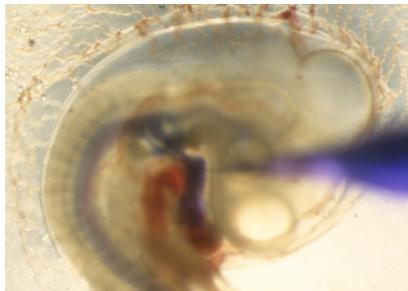


Figura 29

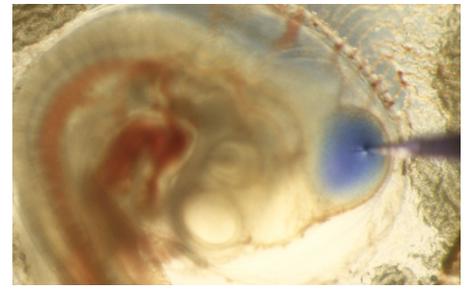


Figura 30

-
Colocación de micro-esferas de látex impregnadas con diferentes compuestos.

Esto sirve para valorar como el bloqueo o la estimulación de ciertas moléculas del embrión puede influir durante el desarrollo embrionario en esbozos específicos. También se puede utilizar para estudios teratológicos. Para implantar microesferas, se realiza primero una pequeña incisión en la superficie embrionaria usando una aguja de tungsteno, en este caso en el espacio intersomático. Seguidamente introducimos la microesfera en la incisión y

empujamos con una pinza de relojero para que se encaje entre los somites. La microesfera puede estar impregnada de anticuerpos, factores de crecimiento etc., y esto nos permite valorar su efecto local en una zona muy específica del embrión. podemos microinyectar moléculas que sospechemos que puedan inhibir o activar ciertos mecanismos del desarrollo de esta estructura y valorar su acción comparando con controles a los que se microinyecte una solución control que carezca de efecto (Figura 31 y 32).

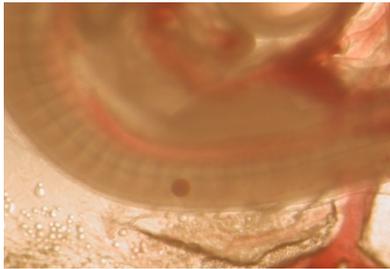


Figura 31

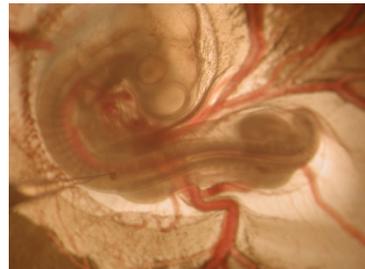


Figura 32

Bibliografía

1. Martha Denis Marrero Pérez LOSRATSAPdLFRG. Las imágenes digitales como medios de enseñanza en la docencia de las ciencias médicas. 2016 ene-mar..
2. Katia Ramírez Fajardo NRM. Use of information and communications technologies in Human I Morphophysiology subject National Program of Comprehensive Community Medicine. 2008..
3. Cavero JSD. Communicative model for videoclass in basic biomedical sciences. 2008..
4. Pedro Monteagudo Valdivia ASMMHM. Video as a teaching average. 2007..
5. Miriam Gutiérrez Escobar RLFYRSMMLBMNRRMOR. New Technological Teaching Aids vs Teacher's Training to Use Them. 2015..
6. embryos Aspftltcoc. Researchgate. [Online].; 1974. Available from: <http://www.researchgate.net/publication/245067384>.
7. Lumsden SCCJCGCSA. Improved Method for Chick Whole- Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier. 2001..
8. Cockroft DL. A Compartative and Historical Review of Culture Methods for Vertebrates. 1997..
9. Huseyin C Yalcin ASAAR,JTB. Jove Journal of Visuelized Emperiments. [Online].; 2010. Available from: <http://www.jove.com/video/2154>.
10. D.A.T. New Technique for the Cultivation of the Chick Embryo in vitro. 1954..

11. Tamao Ono TMMKAKKKOMOMMYGE. A Complete System for Avian Transgenesis, Supporting Quality Embryos from the Single-Cell Stage to Hatching. 1993 Agosto..
12. Tamao Ono TMYTMMMMGE. Culture of Naked Quail, Ova In Vitro for Avian Transgenesis : Culture from the Single-Cell Stage to Hatching with pH Adjusted Chicken Thick Albumen. 1996..
13. Claudio D Stern RB. Early chick embryos in vitro. 1997..