



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Grado en Medicina**

Trabajo Fin de Grado

Curso 2017-2018

# **Microinyección en embriones de pollo: vídeo didáctico**

AUTORES:

- Sandra Ceacero Martínez
- Ana Chamorro Vera

TUTOR:

- D. José Antonio Moro Balbás

## **ÍNDICE:**

- **INTRODUCCIÓN** Página 3
- **MOTIVACIÓN** Página 3
- **OBJETIVO** Página 4
- **MATERIAL Y MÉTODOS** Página 4
- **DESARROLLO DEL TRABAJO** Página 8
- **APLICACIONES** Página 17
- **BIBLIOGRAFÍA** Página 19

## INTRODUCCIÓN

La microinyección es una tecnología que permite la introducción mecánica de soluciones en el interior de la célula mediante una micropipeta, que se controla con la ayuda de un micromanipulador, bajo un microscopio de alta resolución.

Es una técnica muy sensible, en la cual una aguja extremadamente fina, de alrededor de 1 micrómetro, penetra la membrana celular y a veces la envoltura nuclear para verter su contenido.

El empleo de esta técnica como procedimiento biológico comenzó a principios del siglo XX, sin embargo, no era muy común. Fue en la década de 1990, cuando su uso se incrementó de manera significativa, y en la actualidad se considera una técnica común de laboratorio.

De hecho son múltiples las aplicaciones de esta técnica como por ejemplo:

- Microinyección para generación de animales transgénicos y knock-out/knock-in. (Horii T et al. 2014)
- Para introducir sustancias, como fármacos, que modifiquen las funciones fisiológicas de una célula "in vivo". (Moro et al. 1993).
- Microinyección en embriones para el bloqueo de moléculas concretas en zonas muy específicas del embrión mediante anticuerpos o enzimas. (Moro-Balbás et al. 2000).
- Microinyección para inhibir la acción de proteínas, tales como factores de crecimiento y observar si hay alteración en su actividad biológica. (Martín et al. 2006).
- Fecundación in vitro de ovocitos. (van der Westerlaken L et al. 2005).

## MOTIVACIÓN

Hemos elegido este proyecto para el trabajo de fin de grado porque queremos exaltar la importancia de la investigación en el campo de la medicina a través de un vídeo didáctico, puesto que esta manera de abordarla es más atrayente y práctica, que explicarlo con conceptos teóricos.

La investigación necesita traspasar los conocimientos informativos sencillos e involucra además formación en destrezas y actitudes.

Por lo tanto, es fundamental integrar el cine en la medicina, ya que a través de la imagen en movimiento, sus mensajes, sus ideas técnicas y sus contenidos se introducen elementos de indiscutible valor y de indispensable estudio en las aulas. Es una de las estrategias interdisciplinarias por excelencia, vía para lograr la transversalidad, y al mismo tiempo base y fundamento de análisis y estudio de cualquiera de las áreas de un programa de trabajo. (Moratal LM et al. 2010).

El cine puede ser muy útil como recurso de aplicación didáctica. Ayuda a los estudiantes a obtener visiones globales de un tema y guardar imágenes en su memoria que luego les facilitan la recordación de los puntos más relevantes así como la posibilidad de realizar reelaboraciones posteriores sobre su significado.

*<<Quien controle el cine controlará el medio de influencia más poderoso>>*  
(Edison).

## **OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo es fundamentalmente diseñar un vídeo didáctico para complementar los conceptos teóricos de dos asignaturas, la primera es una asignatura optativa del grado en Medicina impartida en el 2º curso de 3 créditos, y la segunda es una asignatura de un Máster de Investigación Biomédica de 3 créditos, el nombre de las mismas es:

- Biología del desarrollo y teratología.
- Desarrollo del sistema nervioso.

Queremos resaltar que este proyecto, además de ser realizado para la presentación de nuestro TFG, va a ser utilizado para las asignaturas mencionadas y damos nuestro consentimiento para que dispongan del él.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para explicar los recursos utilizados en nuestro proyecto, vamos a dividirlo en cuatro pasos:

1. Obtención de micropipetas
2. Microinyección en placa

3. Microinyección “in ovo”
4. Grabación, diseño y edición del vídeo didáctico

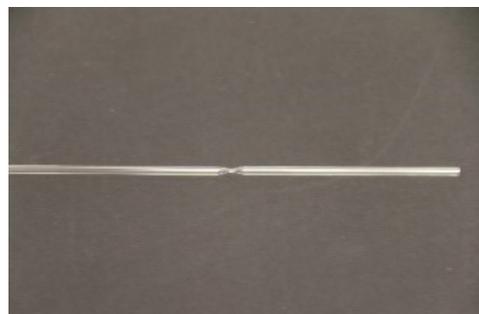
## OBTENCIÓN DE MICROPIPETAS

En primer lugar utilizamos un guión con las tomas que íbamos a filmar proporcionado por nuestro tutor: José Antonio Moro. Estas fueron grabadas en el departamento de Anatomía de la facultad de Medicina. Los materiales que utilizamos para la adquisición de las micropipetas fueron:

- Estirador de pipetas (*Figura 1*)
- Capilar de borosilicato (*Figura 2*)
- Biselador (*Figura 3*)
- Microscopio con objetivo horizontal (*Figura 4*)
- Micropipeta (*Figura 5*)
- Filamentos eppendorf, pipeta de llenado y solución coloreada (*Figura 6*)
- Estereomicroscopio WILD M3, microinyector y micromanipulador (*Figura 7*)



*Figura 1. Estirador de pipetas. La flecha indica las pesas.*



*Figura 2. Capilar de borosilicato preestirado.*



*Figura 3. Biselador.*



*Figura 4. Microscopio con objetivo horizontal.*

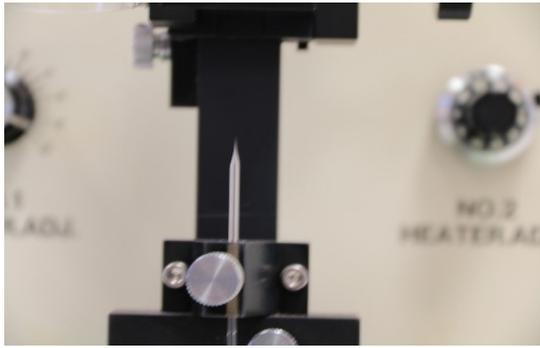


Figura 5. Micropipeta.

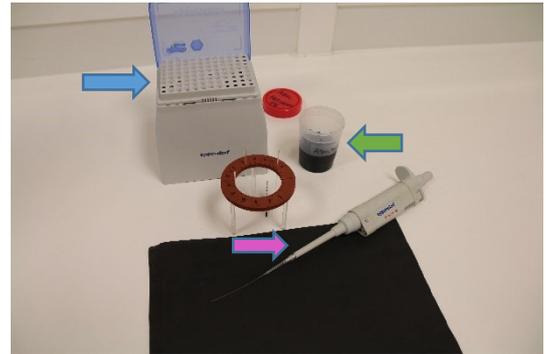


Figura 6. Filamentos eppendorf (azul), pipeta de llenado (rosa) y solución coloreada (verde).

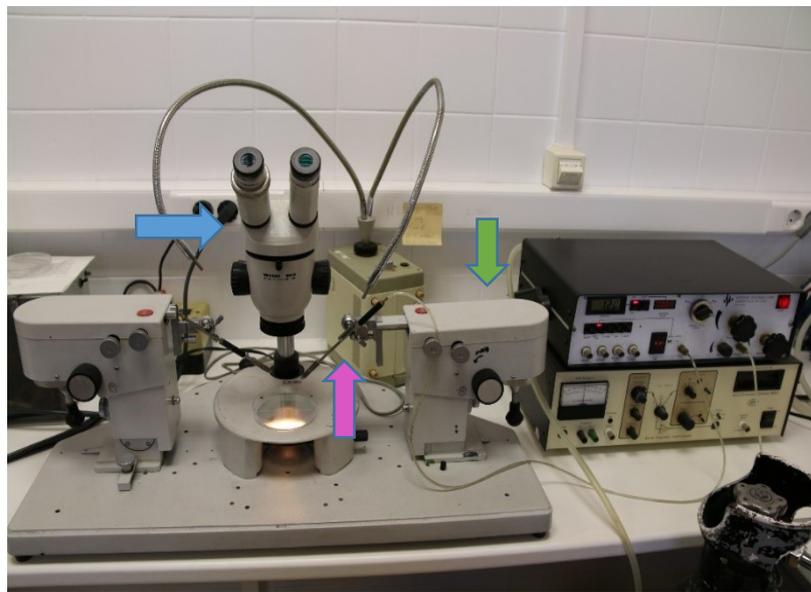


Figura 7. Estereomicroscopio WILD M3 (azul), microinyector (rosa) y micromanipulador (verde).

## MICROINYECCIÓN EN PLACA

- Placa de Petri (Figura 8)
- Ringer lactato
- Pinzas acodadas (Figura 9)
- Tijeras curvas (Figura 10)



Figura 8. Placa de Petri.



Figura 9. Pinzas acodadas.



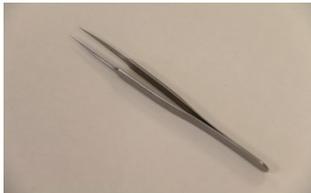
Figura 10. Tijeras curvas.

## MICROINYECCIÓN “IN OVO”

- Aguja de tungsteno (*Figura 11*)
- Pinzas de relojero (*Figura 12*)
- Jeringa estéril (*Figura 13*)



*Figura 11. Aguja de tungsteno.*



*Figura 12. Pinzas de relojero.*



*Figura 13. Jeringa estéril.*

## GRABACIÓN, DISEÑO Y EDICIÓN DEL VÍDEO DIDÁCTICO

Para obtener el material para nuestro vídeo hemos utilizado las siguientes cámaras de vídeo/fotos, dos de ellas para las imágenes macroscópicas y otras dos para las microscópicas:

- Cámara de fotos CANON EOS 70D (*Figura 14*)
- Cámara de vídeo SONY HANDYCAM DCR-SR37E (*Figura 15*)
- Cámara acoplada a estereomicroscopio NIKON COOLPIX 990 (*Figura 16*)
- Cámara acoplada a estereomicroscopio PANASONIC F10 CCD (*Figura 17*)



*Figura 14. Cámara de fotos CANON EOS 70D.*



*Figura 15. Cámara de vídeo SONY HANDYCAM DCR-SR37E.*



*Figura 16. Cámara acoplada a estereomicroscopio NIKON COOLPIX 990*



*Figura 17. Cámara acoplada a estereomicroscopio PANASONIC F10 CCD*

Para el diseño, montaje y edición del vídeo hemos utilizado dos programas, uno de ellos llamado Movie Maker y el otro Cyber Link Power Director 16.

## DESARROLLO DEL TRABAJO

Para explicar de forma detallada la elaboración del vídeo, vamos a dividir este apartado en 4 fases:

1. Fabricación de las micropipetas
2. Micromanipulador y microinyector
3. Microinyección de embriones de pollo en placa
4. Microinyección de embriones de pollo "in ovo"

### **FABRICACIÓN DE LAS MICROPIPETAS**

Para fabricar las micropipetas, colocamos los capilares de borosilicato (*Figura 18*) en un estirador (*Figura 19*), este aparato posee un dispositivo de calentamiento consistente en una resistencia eléctrica en la que se puede variar la intensidad de la corriente para producir más o menos calor. La fuerza de tracción para el estirado de la micropipeta se realiza mediante un sistema de pesas, podemos variar la fuerza de tracción aumentando o disminuyendo el número de pesas.



*Figura 18. Capilar de borosilicato.*



*Figura 19. Estirador de pipetas. La flecha indica la resistencia eléctrica.*

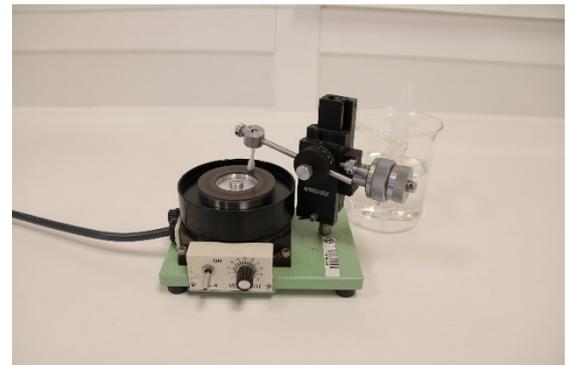
Para obtener las micropipetas, realizamos en primer lugar un preestirado (*Figura 2*), colocamos un tope a la altura deseada para realizar un primer estirado del vidrio, esto nos permite obtener micropipetas de mayor longitud que realizando un solo estirado. Seguidamente retiramos el tope y realizamos el estiramiento definitivo (*Figura 5*).

El siguiente paso consiste en el biselado de la micropipeta (*Figura 20*), necesario para obtener micropipetas con el calibre deseado y con una punta aguda que permita la buena penetración de la misma durante la microinyección. La observación del proceso de biselado se lleva a cabo con un estereomicroscopio (*Figura 7*).



*Figura 20. Biselado de la micropipeta.*

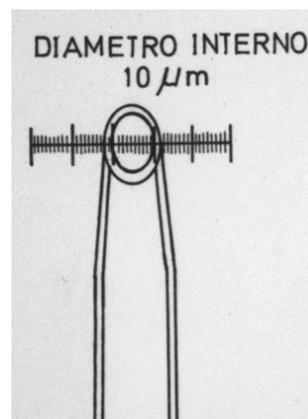
La superficie del biselador debe de ser humedecida, para disminuir la fricción y favorecer la limpieza de su superficie. Esto se realiza colocando sobre el biselador una pequeña torunda de algodón humedecida con agua destilada (*Figura 21*).



*Figura 21. Torunda de algodón humedecida con agua destilada en el biselador.*

Se coloca la micropipeta en un holder y con ayuda de un micromanipulador vamos aproximando la punta de la micropipeta a la superficie del biselador. Esta es la imagen que observamos en el estereomicroscopio (*Figura 3*), se debe de bajar con mucho cuidado la micropipeta, cuanto más descendamos mayor es el diámetro de la punta. Nosotros trabajamos con diámetros de punta entre 10 y 50  $\mu\text{m}$  dependiendo de la estructura que vayamos a microinyectar.

Una vez realizado el biselado de la punta de la micropipeta, procedemos a medir su diámetro. Para esto colocamos la micropipeta en un microscopio que presenta los objetivos en posición horizontal (*Figura 4*). Los oculares disponen de una rejilla calibrada que nos permite medir el diámetro de la punta. Es necesario precisar que debe medirse el diámetro de punta interno o diámetro efectivo para la inyección (*Figura 22*), ya que el diámetro externo depende en gran medida del grosor del vidrio empleado.



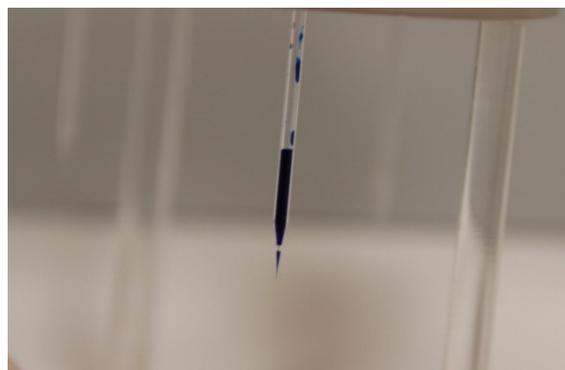
*Figura 22*

Seguidamente guardamos las micropipetas hasta su utilización, en un recipiente (*Figura 23*) que las proteja del polvo y que evite el contacto de la punta con cualquier superficie, para evitar su rotura.



*Figura 23. Almacenamiento de micropipetas.*

Para llenar las micropipetas procedemos de la siguiente forma: conectamos un capilar de plástico, disponible comercialmente, a una pipeta de bajo rango y absorbemos la cantidad de solución deseada (*Figura 6*). A continuación introducimos el capilar de plástico hasta la punta de la micropipeta y expulsamos lentamente la solución (*Figura 24*). También se



*Figura 24. Micropipeta rellena de solución.*

pueden llenar las micropipetas a través de la punta, aspirando la solución con el microinyector (si el aparato dispone de esta función).

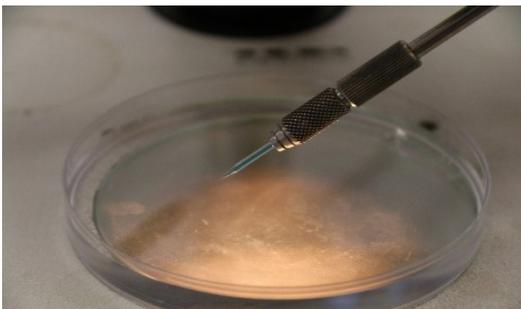
## MICROMANIPULADOR Y MICROINYECTOR

Un micromanipulador (*Figura 25*) es un aparato que nos permite mover la micropipeta hasta el lugar adecuado en el que se va a realizar la microinyección. Reproduce nuestros movimientos pero a una escala muy reducida y con gran precisión, podemos mover la micropipeta en cualquier dirección del espacio.



*Figura 25. Micromanipulador y biselador.*

El microinyector permite inyectar pequeños volúmenes del orden de nanolitros en zonas muy específicas del embrión (*Figura 26*). Este aparato está conectado a una bombona de nitrógeno, que suministra la fuerza de inyección. Posee diferentes funciones a parte de la de inyección, puede realizar aspiraciones de fluidos embrionarios, mediciones de presiones externas y presiones de aclarado para limpiar las micropipetas. La presión y el tiempo de inyección son modificables (*Figura 27*), estos parámetros junto con el diámetro interno de la punta de la micropipeta determinan el volumen de inyección.



*Figura 26*



*Figura 27*

## MICROINYECCIÓN DE EMBRIONES DE POLLO EN PLACA

Esta técnica es especialmente útil para la microinyección de embriones de estadios tempranos que posteriormente vayan a ser cultivados “ex ovo”, su principal desventaja es que los embriones en cultivo no pueden superar el estadio 22-23 de Hamburger y Hamilton.

Antes de comenzar la extracción del embrión rellenamos con solución de 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.

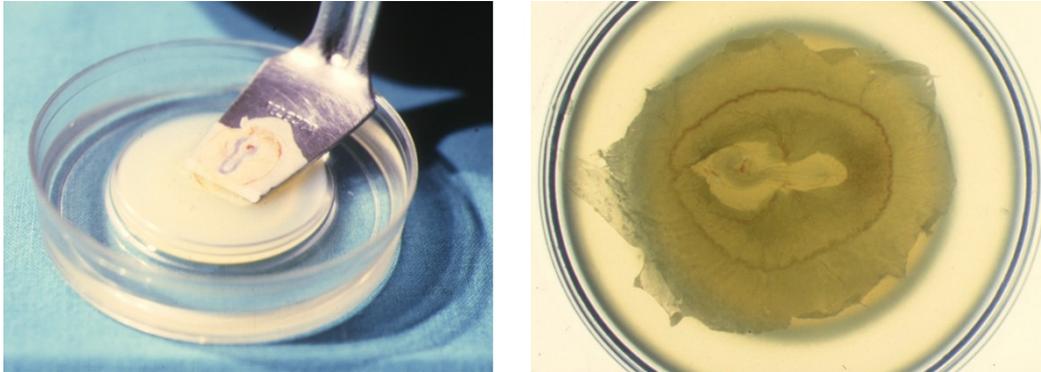
A continuación sujetamos la yema con unas pinzas acodadas y procedemos a recortar con una tijeras curvas la membrana vitelina, lo más alejado posible del área vascular y con cuidado de no dañar ningún vaso. Una vez recortada el área vitelina colocamos el embrión con su área vascular sobre un elevador, arrastrándolo con las pinzas y lo transferimos a una placa de Petri con solución de Ringer a 37°C (*Figura 28*). Una vez obtenido el embrión procedemos a su visualización en un estereomicroscopio. En este momento observamos si la membrana vitelina recubre el área embrionaria, si es así, la retiramos empleando unas pinzas de relojero y realizamos la clasificación del embrión siguiendo los parámetros de Hamburger y Hamilton sobre desarrollo de embriones de pollo.



*Figura 28. Retirada de la membrana vitelina con unas pinzas, elevación del área vascular del embrión y colocación en la placa de Petri.*

Seguidamente eliminamos la solución de Ringer de la placa de Petri en la que se encuentra el embrión con ayuda de una pipeta Pasteur, esto nos permite fijar el embrión al fondo de la placa para que este no se mueva durante la

microinyección. En este momento se puede efectuar la microinyección, esta se realiza observando el área a inyectar bajo un estereomicroscopio (*Figura 29*).

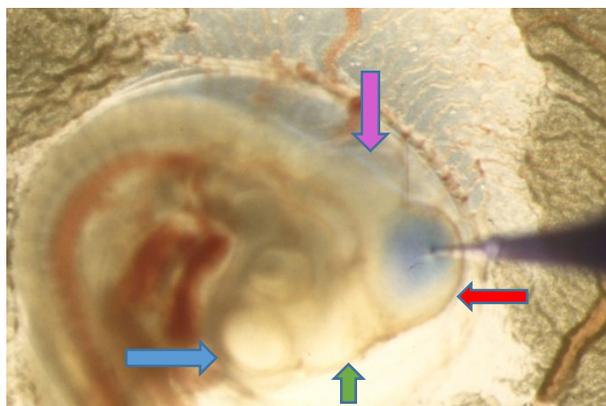


*Figura 29*

## EJEMPLOS DE MICROINYECCIÓN EN PLACA:

### A. MICROINYECCIÓN MESENCEFÁLICA

En primer lugar identificamos la vesícula mesencefálica y la orientamos hacia el brazo del micromanipulador que porta la micropipeta. A continuación seccionamos la membrana amniótica a nivel del mesencéfalo utilizando para ello unas pinzas de relojero (*Figura 12*). Movemos la micropipeta hasta el centro del mesencéfalo y con un movimiento rápido y corto del micromanipulador insertamos la micropipeta en el interior de la cavidad mesencefálica y procedemos a la microinyección (*Figura 30*).



*Figura 30. Microinyección mesencefálica. Telencéfalo (azul). Diencefalo (verde). Mesencéfalo (rojo). Rombencéfalo (rosa).*

## B. MICROINYECCIÓN DE LA VESÍCULA ÓTICA

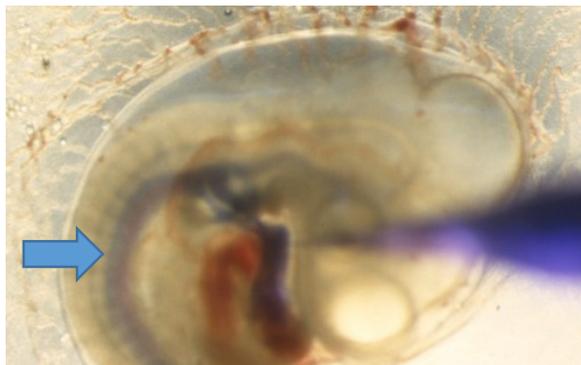
En esta toma vamos a ver la microinyección de la vesícula ótica, se puede observar esta estructura en la región láterodorsal del embrión por detrás de segundo arco branquial. Tras puncionar la vesícula ótica procedemos a la microinyección de una solución coloreada. La cantidad a inyectar en este caso debe de ser muy pequeña dado el escaso volumen del otocisto (*Figura 31*).



*Figura 31. Microinyección en vesícula ótica.*

## C. MICROINYECCIÓN INTRACARDIACA

Se puede microinyectar el asa cardiaca, generalmente a nivel del tronco arterioso. Esta técnica nos permite visualizar el aparato circulatorio del embrión puesto que la solución coloreada difunde rápidamente por vía arterial. También se puede emplear la microinyección cardiaca para perfundir fijadores u otras moléculas o fármacos para que actúen sobre todo el embrión. Por otro lado nos permite obtener sangre embrionaria, para su ulterior análisis, desde estadios muy precoces del desarrollo (*Figura 32*).



*Figura 32. Microinyección intracardiaca. Aorta dorsal (azul).*

#### D. MICROINYECCIÓN EN CAVIDAD AMNIÓTICA

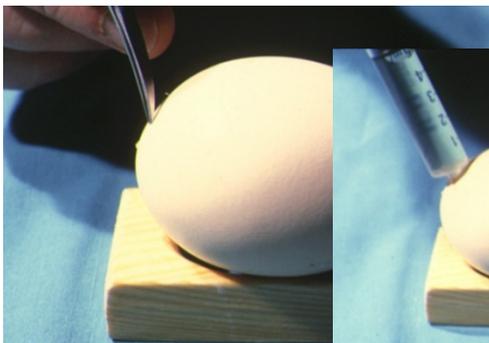
El lugar ideal para esta maniobra es la región comprendida entre el esbozo cardiaco y el polo frontal del embrión. La solución coloreada se localiza entre la superficie embrionaria y el saco amniótico y va rodeando progresivamente al embrión (*Figura 33*).



*Figura 33. Microinyección en cavidad amniótica.*

#### MICROINYECCIÓN DE EMBRIONES DE POLLO “IN OVO”

Para realizar la microinyección “in ovo” colocamos el huevo fértil e incubado en un soporte, en posición horizontal, en la misma orientación que tenía en la incubadora (*Figura 34*). Seguidamente hacemos un pequeño orificio en la parte ancha del huevo con ayuda de unas tijeras, por este orificio introducimos una jeringa estéril y extraemos un pequeño volumen de clara (*Figura 35*). Utilizando unas tijeras practicamos una apertura en la cáscara y abrimos una ventana que nos permite visualizar el embrión y el área vascular circundante (*Figura 36*).



*Figura 34*



*Figura 35*

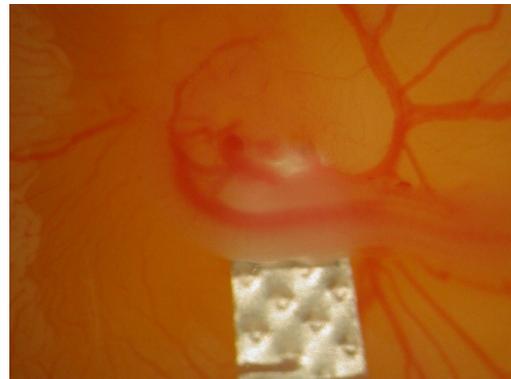


*Figura 36*

A continuación observamos el embrión bajo un estereomicroscopio y con ayuda de una aguja de tungsteno (*Figura 11*) realizamos una incisión en la membrana vitelina y retiramos esta membrana del área embrionaria (*Figura 37*). Seguidamente colocamos un soporte por debajo de la zona del embrión en la que se va a realizar la microinyección, este soporte está sujeto al brazo izquierdo del micromanipulador y nos permite mantener fija la posición del embrión durante el proceso de microinyección (*Figura 38*). Con ayuda de unas pinzas de relojero retiramos la membrana amniótica en la zona de microinyección (*Figura 39*) e inmediatamente después se introduce la micropipeta en el área de inyección con ayuda del brazo derecho del micromanipulador.



*Figura 37. Retirada de membrana vitelina con aguja de tungsteno.*



*Figura 38. Soporte sujeto al brazo del micromanipulador para mantener fija la posición del embrión.*



*Figura 39. Retirada de la membrana amniótica con pinzas de relojero.*

En esta imagen se puede observar una microinyección “in ovo” del asa cardíaca (Figura 40).

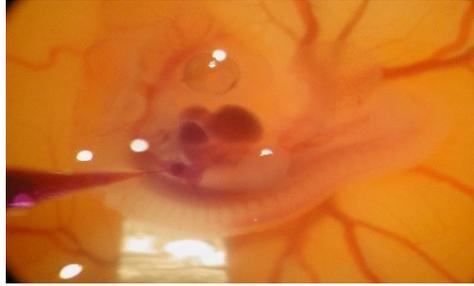


Figura 40. Microinyección “in ovo” del asa cardíaca.

En esta imagen podemos ver otro ejemplo de microinyección “in ovo”, en este caso la solución se inyecta en el tronco del embrión, en el espacio comprendido entre dos somites (Figura 41).

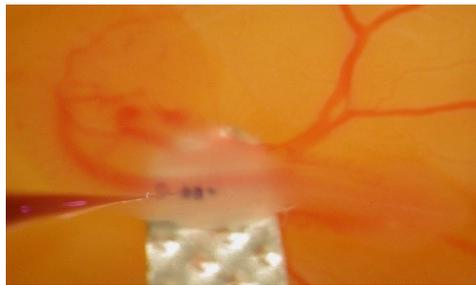


Figura 41. Microinyección “in ovo” entre dos somites.

Una vez realizada la microinyección se sella la abertura de la cáscara con cinta adhesiva transparente y se procede a la reincubación del huevo hasta el momento de su extracción.

### **APLICACIONES DE LA MICROINYECCIÓN**

Tras revisar varios artículos relacionados con la utilidad de la microinyección, hemos llegado a la conclusión de que esta técnica se utiliza fundamentalmente en:

- Generación de animales transgénicos y knock-out/knock-in: se puede aplicar esta técnica para producir animales con múltiples genes inactivados implicando a varios genes de una vía bioquímica, así como desarrollar animales que tienen genes inactivados en un determinado

tejido, o que contienen genes discapacitados en lugar de inactivados. También permite inactivar un gen sólo en tejidos particulares y/o a tiempos específicos durante su ciclo de vida. (Horii T et al. 2014).

- Fecundación in vitro de ovocitos: esta técnica consiste en elegir un espermatozoide con buena movilidad y aspirarlo en el interior de una aguja de microinyección para posteriormente introducirlo en el interior de un óvulo, con el objetivo de obtener embriones de buena calidad. (van der Westerlaken L et al. 2005).
- Obtención y análisis de líquidos embrionarios. De esta forma se ha determinado la concentración y composición proteica del fluido cerebroespinal embrionario en fases muy precoces del desarrollo del embrión de pollo (Gato et al. 2004).
- Bloqueo de moléculas en zonas muy específicas del embrión y en el estadio exacto en el que estas moléculas se expresan. En este sentido, se pueden utilizar enzimas que degraden la molécula que estamos analizando, por ejemplo se ha comprobado que la microinyección de enzimas que degradan el heparán sulfato proteoglicano de la matriz extracelular alteran la invaginación y formación de la placoda ótica (Moro-Balbás et al. 2000).
- La microinyección se puede usar también para inhibir la acción de proteínas, tales como factores de crecimiento, se pueden emplear anticuerpos específicos que alteren su actividad biológica, en este sentido se ha demostrado que la microinyección mesencefálica de anticuerpos frente al factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 altera la proliferación y diferenciación de los neuroblastos (Martín et al. 2006), por lo que este factor debe estar implicado en los procesos mencionados.
- Análisis de los procesos de emigración celular durante el desarrollo embrionario. Mediante microinyección se puede marcar un grupo celular y seguir sus rutas migratorias. Igualmente podemos introducir en estas rutas migratorias moléculas que activen o alteren el proceso de emigración celular. De esta forma se ha comprobado que algunas moléculas de la matriz extracelular, como el condroitín sulfato proteoglicano, inhiben la emigración de células de la cresta neural en embriones de pollo (Moro-Balbás et al. 1998).

- También se puede utilizar la microinyección para la realización de estudios teratológicos muy selectivos, se puede inyectar un fármaco en estadio muy preciso del desarrollo embrionario, así se ha demostrado que la microinyección subgerminal de ácido retinoico (vitamina A) en embriones de pollo de estadios 9-10 H-H altera la emigración de las células de la cresta neural (Moro et al. 1993).

## BIBLIOGRAFÍA

- Gato, A., Martín, P., Alonso M.I., Martín, C., Pulgar, M.A. and Moro, J.A. Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J. Exp. Zool.* 301A:280-289 (2004)
- Laura María Moratal Ibáñez, Laura Bertilotti, Silvia Debenedetti, Claudia Degrossi, Hernán Aldana Marcos. *Revista de medicina y cine.* Vol 6. Num1 (2010).
- Martin C, Bueno D, Alonso MI, Moro JA, Callejo S, Parada C, Martin P, Carnicero E, Gato A. FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Dev Biol.* 297:402-16 (2006).
- Moro-Balbás, J.A., Gato, A., Alonso, M.I., Martín, P. and de la Mano A. Basal Lamina heparan sulphate proteoglycan is involved in otic placode invagination in chick embryos. *Anat.Embryol.* 202:333-343. (2000)
- Moro Balbás, J.A., Gato, A., Alonso, M.I. and Barbosa, E. Local increase level of chondroitin sulfate induces changes in the rhombencephalic neural crest migration. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 207-216. (1998).
- Moro, J.A., Gato, A., Alonso, M.I., Pastor, J.F., Represa, J.J. and Barbosa, E.- Retinoic acid induces changes in the rhombencephalic neural crest cells migration and extracellular matrix in chick embryos. *Teratology* 48: 197-206 (1993)
- Takuro Horii, Yuji Arai, Miho Yamazaki, Sumiyo Morita, Mika Kimura, Masahiro Itoh, Yumiko Abe & Izuho Hatada. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Reports.* Vol 4: 4513 (2014).
- van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S, Naaktgeboren N. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 83:612-617 (2005).
- <http://educomunicacion.es/cineyeducacion/cineeducacion.htm>