

Técnicas de Cultivo en Embriones de Pollo

Tutor:

José Antonio Moro Balbás

María Ordoñez Marina

Sarai Palacios González

Introducción

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.

Material y Métodos

- Cámara SONY HANDYCAM DCR-SR37E
- NIKON COOLPIX 990
- Microscopio estereoscópico SMZ800
- CANON EOS 70D
- Sony Vegas Pro 13.0
- Programa de edición de vídeo Adobe Premiere
- Micrófono integrado EarPods, de Apple
- 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



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.

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

1. Usamos campana de flujo laminar y el material debe esterilizarse o bien utilizar de un solo uso



2. Juntamos 50 cc de un huevo no fértil + 50 cc de Ringer estéril.



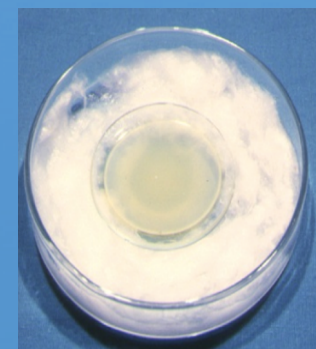
3. Metemos tubos de ensayo estériles en centrifugadora a 1800 rpm y recogemos sobrenadante



4. Mezclamos sobrenadante con Solución Agar previamente preparada



1. Medio de Cultivo: Anillo de algodón mojado con suero Ringer + Vidrio de reloj con medio de cultivo.

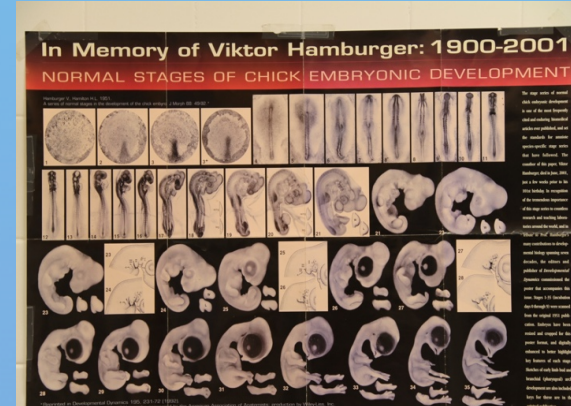


Obtención de Embriones

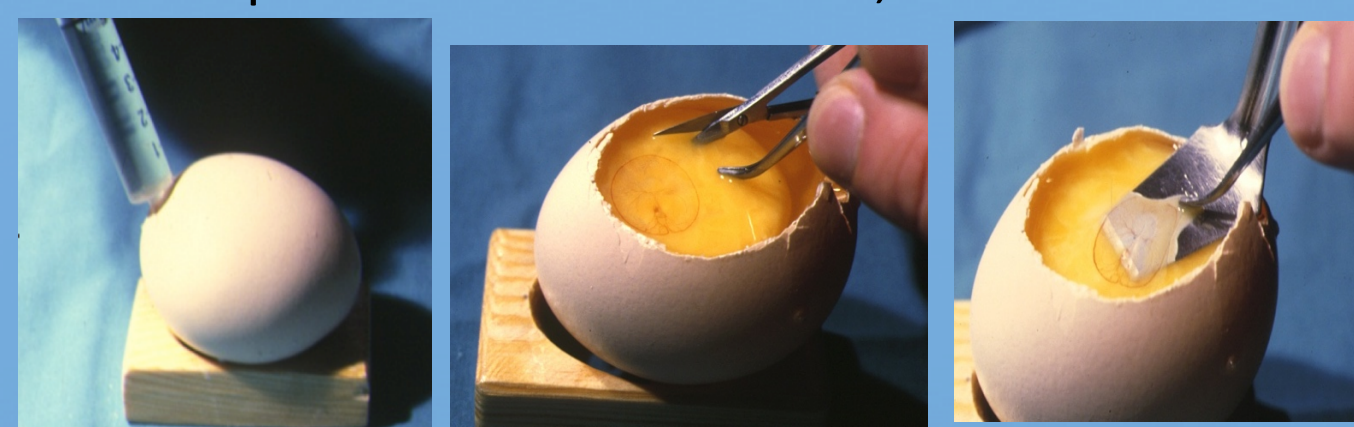
- Los huevos se encuentran colocados horizontalmente en la incubadora, ya que los embriones se localizan en la parte superior del huevo



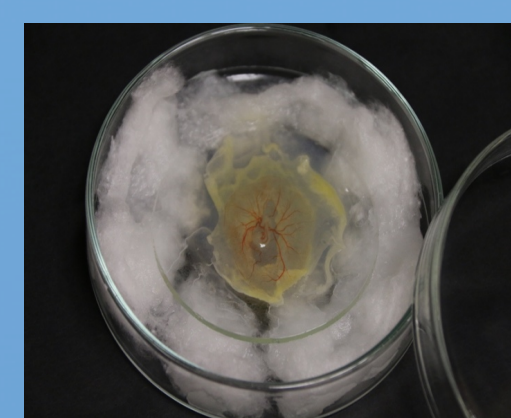
- Estadío 18 a 20 de Hamburger lo que equivale a 65-72 horas de incubación



- Se deposita el huevo en un soporte, se realiza un pequeño orificio por el que extraemos la clase con un a jeringa, a continuación lo abrimos con unas tijeras y le quitamos la membrana vitelina respetando el área vascular,

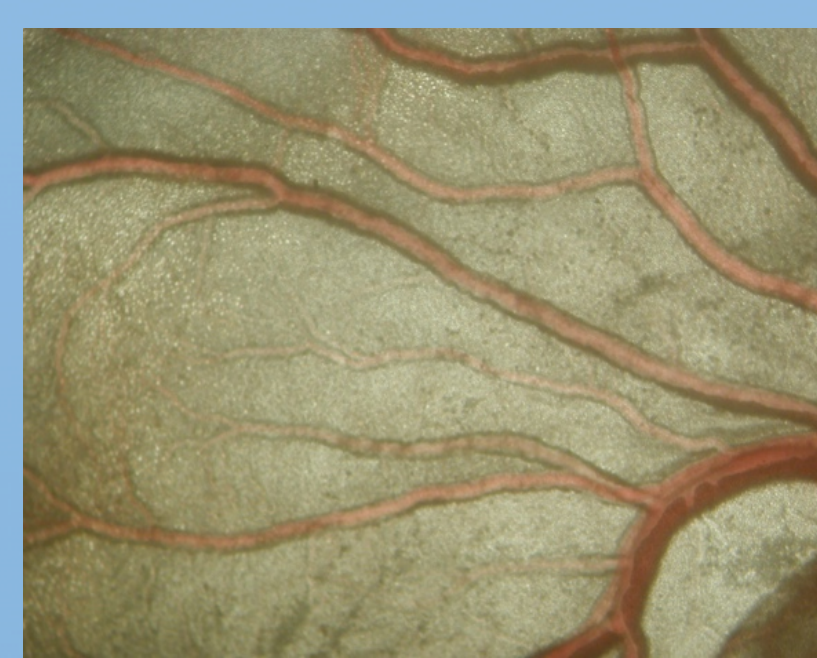
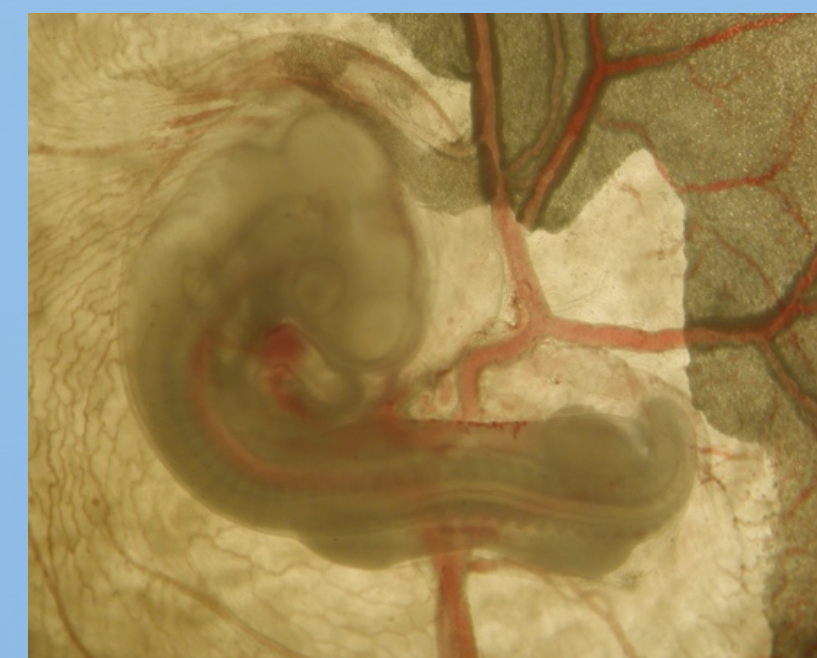


- usamos un elevador y depositamos el embrión en una placa de Petri con Ringer a 37 °C



Preparación del cultivo

1. Las cámaras de cultivo deben encontrarse a 37°C
2. Colocamos el embrión sobre el medio de cultivo (al que le hemos vertido una pequeña cantidad de Ringer)
3. Estiramos con unas pinzas de relojero el área vascular
4. Retiramos el Ringer con una pipeta Pasteur
5. Vemos con el estereomicroscopio como late el corazón
6. Lo introducimos 24 horas en la incubadora, comprobamos tras este tiempo que el embrión ha crecido hasta el estadio 22 de Hamburger



Extracción del embrión del medio de cultivo

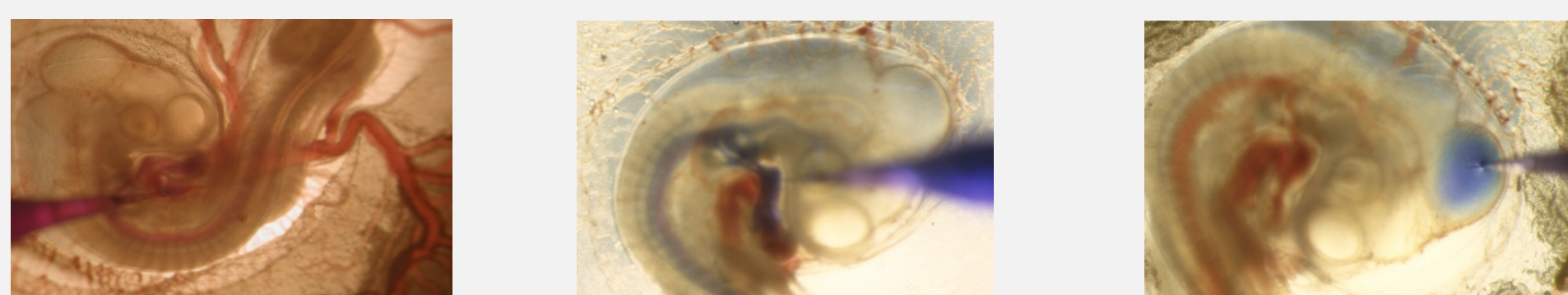
Por último procedemos a la extracción del embrión del medio de cultivo, primero depositamos ringer sobre dicho medio y a continuación despegamos el embrión y su área vascular con unas pinzas de relojero. A continuación lo recogemos con el elevador y lo pasamos a otra placa de Petri que tiene Ringer a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

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.

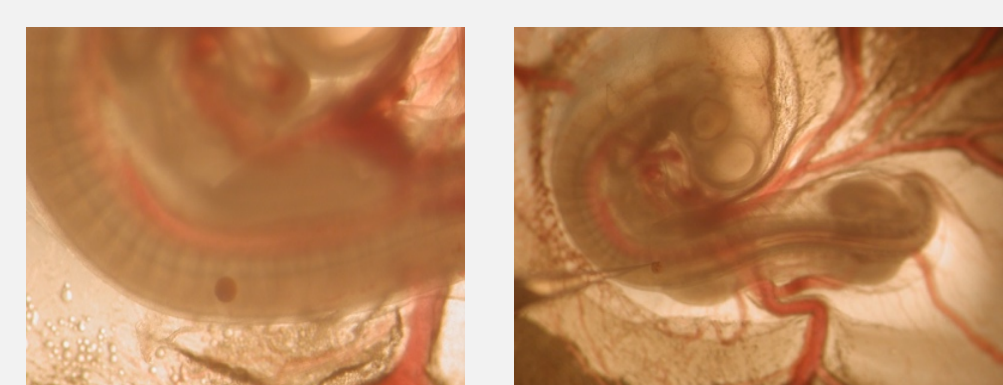


Aplicaciones

Microinyección embrionaria de diferentes compuestos en áreas muy concretas del embrión



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.



Bibliografía

- Britt G and Herrman H. (1959). Protein accumulation in early chick embryos. Growth under different conditions of explantation. J. Embryol. Exp. Morph. 7:66-72.
- Hamburger V, Hamilton HL. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88:49-92.
- Robert Auerbach, Louis Kubai, David Knighton, and Judah Folkman. (December 1974) A Simple Procedure for the Long-Term Cultivation of Chicken Embryos. Developmental Biology
- Susan C. Chapman, Jerome Collignon, Gary C. Schoenwolf and Andrew Lumsden. (2001) Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier DEVELOPMENTAL DYNAMICS 220:284-289
- David L. Cofroft. (1997). A comparative and historical review of culture methods for vertebrates. Int. J. Dev. Biol. 41
- Huseyin C. Yalcin 1,2, Akshay Shekhar1, Ajinkya A. Rane1, Jonathan T. Butcher 1 (2010) An ex-ovo Chicken Embryo Culture System Suitable for Imaging and Microsurgery Applications. Journal of Visualized Experiments disponible en <http://www.jove.com/video/2154>